

⑪ 公表特許公報 (A)

平5-502998

⑤Int.Cl.⁵
C 12 N 5/06
A 61 L 27/00識別記号
Z 7038-4C
7236-4B C 12 N 5/00④公表 平成5年(1993)5月27日
審査請求 未請求
予備審査請求 有 部門(区分) 1 (1)
E※
(全39頁)

⑥発明の名称 望ましい細胞接着効果をもつ表面

⑦特 願 平2-513835

⑧⑨出 願 平2(1990)9月27日

⑩翻訳文提出日 平4(1992)3月30日

⑪国際出願 PCT/US90/05525

⑫国際公開番号 WO91/05036

⑬国際公開日 平3(1991)4月18日

優先権主張 ⑭1989年9月28日⑮米国(U S)⑯414,144

⑰発明者 フベル, ジエフリー, エイ. アメリカ合衆国78703 テキサス州オースチン, ビバリー ドライ
ブ 3006⑲出願人 ポード オブ リージエンツ, アメリカ合衆国78701 テキサス州, オースチン, ウエスト セブ
ザ ユニバーシティ オブ テンス ストリート 201
キサス システム

⑳代理人 弁理士 浅村 岬 外3名

㉑指定期 A T, A T(広域特許), A U, B B, B E(広域特許), B F(広域特許), B G, B J(広域特許), B R, C A, C F
(広域特許), C G(広域特許), C H, C H(広域特許), C M(広域特許), D E, D E(広域特許), D K, D K(広
域特許), E S, E S(広域特許), F I, F R(広域特許), G A(広域特許), G B, G B(広域特許), H U, I T
(広域特許), J P, K P, K R, L K, L U, L U(広域特許), M C, M G, M L(広域特許), M R(広域特許), M
W, N L, N L(広域特許), N O, R O, S D, S E, S E(広域特許), S N(広域特許), S U, T D(広域特許),
T G(広域特許)

最終頁に続く

淨書(内容に変更なし)
請求の範囲

1. 共有結合的に連鎖したペプチドが化学的に付着し、当該ペプチドが12アミノ酸残基よりも少ない、表面からなる細胞培養基質。
2. 当該ペプチドが、細胞認識アミノ酸配列RGD、YIGSR、またはREDVを含む、請求項1の細胞培養基質。
3. 当該ペプチドが少なくとも

RGD: GYIGSRY; RGDF;
GPDSGRY: GRGD: YIGSRY;
GRGDF: IKVAV: RGDY: REDV:
GIKVAV: IKVAVY: GRGDY:
GREDV: PDSGR: GIKVAVY; 及び
YIGSR: GREDVY: GDPDSGR:
GIKVAVY: GYIGSRR:
からなる群から選ばれたものである、請求項1の細胞培養基質。

4. 当該ペプチドが3及び9アミノ酸残基の間をもつ、請求項1の細胞培養基質。
5. 当該ペプチドが4または6アミノ酸残基をもつ、請求項1の細胞培養基質。
6. ペプチドが4アミノ酸残基をもち、さらにG R G Dとして限定される、請求項5の細胞培養基質。
7. ペプチドが6アミノ酸残基からなり、さらに

GYIGSRRとして限定される、請求項5の細胞培養基質。

8. ペプチドが6アミノ酸残基からなり、さらにGREDVとして限定される、請求項5の細胞培養基質。
9. ペプチドが6アミノ酸残基からなり、さらにGRDSGRとして限定される、請求項5の細胞培養基質。
10. ペプチドが6アミノ酸残基からなり、さらにGIKVAVとして限定される、請求項5の細胞培養基質。
11. 基質が1つのセラミック；1つのポリマー及び1つの金属からなる群から選ばれた材料からなる、請求項1の細胞培養基質。
12. 基質が1つのポリマー；または1つのセラミックからなる、請求項1の細胞培養基質。
13. 基質が1つのセラミックからなる、請求項1、2または3の細胞培養基質。
14. セラミックがガラスである、請求項1-3の細胞培養基質。
15. ガラスがグリセロルプロビルシランの結合したガラスからなる、請求項1-4の細胞培養基質。
16. ペプチドがGRGDYまたはGYIGSRYペプチドからなる、請求項1-5の細胞培養基質。
17. 基質が1つのプラスチック；1つのポリ(ヒドロキシエチルメチルアクリレート)；1つのポリ(エチ

特表平5-502998 (2)

- レンテレフタレート) ; 1つのポリ(テトラフルオロエチレン) ; 1つの弗化エチレン；及び1つのポリ(ジメチルシロキサン)から成る群から選ばれたポリマーからなる請求項1の細胞培養基質。
18. ポリマーがポリ(ヒドロキシエチルメタクリレート)である、請求項1の細胞培養基質。
19. ベブチドがGRGDである、請求項1-8の細胞培養基質。
20. ポリマーがポリ(エチレンテレフタレート)である、請求項1の細胞培養基質。
21. ベブチドがGRGDまたはGYIGSRである、請求項2-9の細胞培養基質。
22. 金属がチタニウムである、請求項11の細胞培養基質。
23. ベブチドがおよそ0.001 picomoles/cm²とおよそ100 picomoles/cm²の間の表面濃度で、基質に付着している、請求項4の細胞培養基質。
24. ベブチドがおよそ0.5 picomoles/cm²とおよそ20 picomoles/cm²の間の表面濃度で、基質に付着している、請求項4の細胞培養基質。
25. ベブチドがおよそ1.2 picomoles/cm²の表面濃度で基質に付着している、請求項4の細胞培養基質。
26. ベブチドで化学的に表面を誘導する；及び、ベブチドが誘導した表面に植えつける細胞からなり、ベブチドが長さが1-2アミノ酸残基より少なく、またアミノ
36. 表面が、1つの組織培養フラスコ；1つのベトリ皿、微粒子担体；大粒子担体；繊維；单一の材料から成る支持体；及び回転瓶から成る群から選ばれた用具の表面からなる、請求項3-5の方法。
37. 表面が、1つのセラミック；1つのポリマー；及び1つの金属から成る群から選ばれた材料からなる、請求項2-6または3-5の方法。
38. 金属がチタニウムである、請求項3-7の方法。
39. 表面が1つのポリマーからなる、請求項3-7の方法。
40. ベブチド上のグリシンリンカーアームの末端第一アミンが、塩化トレシル活性によってポリマー表面のヒドロキシル群へ移植される、請求項3-7の方法。
41. ポリマーがポリ(ヒドロキシエチルメチルアクリレート)である、請求項3-9の方法。
42. ベブチドが少なくとも、
GYIGSR； GRDV； GDPSGRY；
GRGD； REDVY； IKVAV；
RGDY； GREDVY； IKVAV；
GRGDY； RGDF； GIKVAV；
GYIGSRY； GRGDF； IKVAV；及び
YIGSRY； PDSGR； GIKVAVY。
REDV； GDPSGR；
からなる群から選ばれた1つである、請求項2-6または3-5の方法。
27. 動物細胞はヒト、ネズミ、昆虫またはブタの細胞である、請求項2-6の方法。
28. 細胞はヒトの細胞である、請求項2-6の方法。
29. 細胞は3T3細胞、大動脈細胞、または包皮細胞である、請求項2-6の方法。
30. 細胞は3T3繊維芽細胞(ATCC#CRL-1658)からなる請求項2-6の方法。
31. 細胞はヒト包皮繊維芽細胞からなる、請求項2-6の方法。
32. 表面が、およそ0.001 picomoles/cm²とおよそ100 picomoles/cm²の間のベブチド濃度からなる、請求項2-6または2-8の方法。
33. 表面が、約0.5 picomoles/cm²と約20 picomoles/cm²の間のベブチド濃度からなる、請求項2-6または2-8の方法。
34. 表面が、約1.2 picomoles/cm²のベブチド濃度からなる、請求項2-6または2-8の方法。
35. 表面の活性反応群成分；表面反応群成分へ結合するベブチド；及び表面の反応群へ共有的に結合するベブチド、からなり、当該ベブチドは、1-2アミノ酸残基より小さく、細胞培養表面の表面活性群成分へ共有結合を形成する、細胞培養表面修飾方法。
43. ベブチドがGRGDであり、ベブチドのアミンと表面の水酸基成分の間の共有化学結合によって、化学的に付着する、請求項4-1の方法。
44. ベブチドのグリシンリンカーアーム上の末端第一アミンが、塩化トレシル活性によってポリマー表面の水酸基群へ移植される請求項3-5の方法。
45. 表面の反応群は、グルタルアルデヒド；塩化シアン；塩化スルホニル；臭化シアン；及びトリフルオロエタンスルホニルクロライド。から成る群から選ばれた化学薬品へ表面を曝露することによって活性化されるであろう、請求項2-7の方法。
46. 塩化トレシルによる処理で、ポリマー表面の表面反応成分を活性化し；そしてベブチド-結合表面を作成するために、ポリマーの活性化表面成分へ、グルシル末端アミンを経由してGRGDベブチドを結合する、ことからなるポリマー表面へベブチドを結合する方法。
47. 塩化トレシル処理は、ポリマー表面を、乾燥エーテル、トリエチルアミン及び塩化トレシルへ、室温で1-5分間曝露することからなる、請求項4-6の方法。
48. GRGDベブチドのポリマー表面への結合は、さらに、活性化表面をアルカリ性緩衝液ですすぎ；また結合方法はさらに、約60-100 ng/mlのGRGDベブチドの濃度をもつ塩基性緩衝溶液中で、すすいだ表面を培養するように限定されることからなる、請求項4-6の方法。

特表平5-502998 (3)

49. ポリマー表面はポリ(ヒドロキシエチルメタクリレート)からなる、請求項48の方法。

50. 水酸基成分によって、前処理をおこなったポリマーを形成するため、ポリマーをホルムアルデヒド及び酢酸の混合液中に浸す；前処理を行ったポリマーを、乾燥エーテル、トリフルオロエタンスルホニルクロライド及びトリエチルアミンの混合液に浸す；浸した前処理ポリマーを中性緩衝溶液ですすぐ；そしてペプチド結合表面を作成するため、10ng/mlと100mg/mlの間のペプチドを含む緩衝溶液中で、すすいだ前処理ポリマーを培養することからなる、水酸基のないポリマー表面へ、ペプチドを結合する方法。

51. ホルムアルデヒドと酢酸の混合液は約18.5% (v/v) のホルムアルデヒドと約1Mの酢酸からなる、請求項50の方法。

52. ポリマーは、ホルムアルデヒドと酢酸の混合液に室温で約4時間浸される、請求項50の方法。

53. 緩衝溶液は、約0.2Mの重炭酸ソーダ緩衝溶液でpH1.0、からなる、請求項50の方法。

54. ペプチドは約10ng/mlRGDペプチドである、請求項50の方法。

55. すすいだ前処理ポリマーは、室温で約20時間培養される、請求項50の方法。

56. ペプチド結合表面は、約0.001 picomoles/cm²と約100 picomoles/cm²の間のペプチド濃度

からなる、請求項50の方法。

57. ベプチド結合表面は、約0.001 picomoles/cm²と約20 picomoles/cm²の間のベプチド濃度をもつ、請求項50の方法。

58. ベプチド結合表面は約12 picomoles/cm²のベプチド濃度からなる、請求項50の方法。

59. 前処理したポリ(エチレンテレフタレート)表面を形成するため、ポリ(エチレンテレフタレート)を、約18.5% (v/v) のホルムアルデヒド及び1M酢酸からなる混合液に室温で約4時間浸す；トレシル活性化された表面を形成するため、前処理した表面を、約20ml乾燥エーテル、約40μlの2,2-トリフルオロエタンスルホニルクロライド及び約2mlトリエチルアミンからなる混合液に室温で15分間浸す；トレシル活性化された表面を約0.2Mの重炭酸ソーダ、pH1.0の緩衝溶液中ですすぐ；そして、化学的に結合したペプチドをもつポリ(エチレンテレフタレート)表面を形成するため、すすいだトレシル活性化表面を、60-100ng/mlの間のGRGD, GDPDSGR, GIKVAV, またはGYIGSRペプチドをもつ0.2Mの重炭酸ソーダ緩衝溶液中で約20時間室温で培養することからなり、当該方法は、約0.001 picomoles/cm²と約20 picomoles/cm²の間の表面濃度を与える、ペプチドをポリ(エチレンテレフタレート)表面へ化学的に結合する方法。

60. 用具の表面にペプチドを共有結合的に付着させ、

当該ペプチドは12アミノ酸残基より少なく、細胞の用具表面への細胞受容体媒介付着を容易にするアミノ酸配列を含むことからなるin vivoの移植用生体医療用具を製造する方法。

61. 生体医療用具は、眼内レンズ；縫合；隆茎移植；心臓移植；股関節部移植；カテーテル；人工静脈；人工動脈；人工腫移植；人工腱；人工韌帶；人工骨ねじ；人工骨板；人工骨片；人工骨関節；人工皮膚；及び人工神経成長ガイド、からなる群から選ばれる、請求項58の方法。

62. 生体医療はカテーテルまたは人工神経成長ガイドである、請求項61の方法。

63. 生体医療用具はポリエチレンからなるカテーテルである、請求項63の方法。

64. ペプチドは

RGD: GYIGSRY; RGDF;
GPDSSGR: GRGD; YIGSRY;
GRGDF: GDPDSGRY: RGDY;
REDV: GRGDFY: IKVAVC;
GRGDY: GREDV; RGDFY;
IKVAVCY: YIGSR: GREDVY;
PDSGR: GIKVAVC; 及び
GYIGSR: REDVY; PDSGRY;
GIKVAVCY.

からなる群から選ばれる、請求項58の方法。

65. ペプチドはGRGD, GDPDSGR, GIKVAVまたはGYIGSRである、請求項60の方法。

66. 物理的に内部に入り込む水溶性ポリマーの表面をもつ水不溶解ベースポリマーからなる物質の構成。

67. 物理的に内部に入り込む水溶性ポリマーの表面をもち、当該水溶性ポリマーは、細胞を付着するための共有結合的に付着したペプチドをもち、ベースポリマーに組み込まれる前後に、内部に入り込む水溶性ポリマーを形成する、水不溶解ベースポリマーからなる細胞培養または生体医療用基質。

68. ペプチドが少なくとも、RGD, REDV, PDSSGR, 及びIKVAVの1つからなる、請求項67の細胞培養基質。

69. 当該ペプチドは、少なくとも
RGD: YIGSRY: GRGDF;
GPDSSGRY: GRGD: REDV;
GRGDFY: PDSGRY: RGDY;
GREDV: RGDFY: IKVAV;
GRGDY: GREDVY: GIKVAV;
IKVAV: YIGSR: REDVY;
PDSGR: IKVAVY; 及び
GYIGSR: RGDF: GDPDSGR;
GIKVAVY, GYIGSRY;

からなる群から選ばれる1つである、請求項67の細胞

特表平5-502998 (4)

培養基質。

70. 当該ペプチドは、3及び9の間のアミノ酸残基からなる、請求項6-7の細胞培養基質。

71. 当該ペプチドは、4または6アミノ酸残基からなる、請求項6-7の細胞培養基質。

72. ベースポリマーは、ポリ(エチレンテレフタレート)、ポリ(ウレタン)、ポリ(メチルメタクリレート)、またはポリ(スチレン)、である、請求項6-7の物質の構成または請求項6-8の細胞培養基質。

73. ベースポリマーは熱可塑性プラスチックである、請求項6-7の物質の構成または請求項6-8の細胞培養基質。

74. ベースポリマーは高度の膨潤性熱可塑性ポリマーである、請求項6-7の物質の構成または請求項6-8の細胞培養基質。

75. ベースポリマーはポリ(エチレンテレフタレート)である、請求項6-7の物質の構成または請求項6-8の細胞培養基質。

76. 水溶性ポリマーは、ポリエチレングリコール、ポリエチレンオキシド、ポリ(エチロキサゾリン)、またはポリ(N-ビニルビロリドン)である、請求項6-7の物質の構成または請求項6-8の細胞培養基質。

77. 水溶性ポリマーが、ポリ(エチレングリコール)またはポリ(エチレンオキシド)である、請求項6-7の物質の構成または請求項6-8の細胞培養基質。

ド)、ポリ(ビニルビロリドン)、またはポリ(エチロキサゾリン)である、請求項8-2の方法。

84. 溶媒は、トリフルオロ酢酸水溶液、テトラヒドロフラン水溶液またはアセトン水溶液である、請求項8-2の方法。

85. 重合基質はポリ(エチレンテレフタレート)である請求項8-2の方法。

86. 重合基質はポリ(エチレンテレフタレート)であり、水溶性ポリマーはポリ(エチレンオキシド)またはポリ(エチレングリコール)である請求項8-2の方法。

87. ベース重合基質は、ポリ(エチレンテレフタレート)、ポリ(ウレタン)またはポリ(メチルメタクリレート)である請求項8-2の方法。

88. 水溶性ポリマーは、ポリ(エチレングリコール)、ポリ(エチレンオキシド)、ポリ(ビニルビロリドン)、またはポリ(エチルオキサゾリン)である請求項8-2の方法。

89. 水溶性ポリマーは、5000より大きく、100000より小さな分子量をもつ、請求項8-2または8-6の方法。

90. 水溶性ポリマーは約18500の分子量をもつ、請求項8-2または8-6の方法。

91. 水溶性ポリマーは単独重合体である、請求項8-2または8-6の方法。

92. 停止ポリマーは水溶性ポリマーを溶解するが、

78. 水溶性ポリマーは、5000より大きく、100000より小さな分子量をもつ、請求項7-7の構成または基質。

79. 水溶性ポリマーは、分子量が5000より大きく、100000より小さい、請求項6-7の物質の構成または請求項6-8の細胞培養基質。

80. 水溶性ポリマーは、約18500の分子量をもつ、請求項6-7の物質の構成または請求項6-8の細胞培養基質。

81. ベースポリマー及び水溶性ポリマーは、少なくとも1つの共通の溶媒をもつ、請求項6-7の物質の構成または請求項6-8の細胞培養基質。

82. ベース重合基質の少なくとも一部を溶解しうる溶媒で、水溶性ポリマーの溶液を作る工程；ベース重合基質の表面の重合成分をゆるめる溶液で、ベース重合基質を処理する工程；及びゆるめた表面ポリマー成分を元の位置にもどし、それによって水溶性ポリマーの内部に入り込んだ鎖が補集されるように、処理したベース重合基質を停止溶媒にさらす工程からなる、水溶性ポリマー鎖が内部に入り込むネットワークを備えた表面をもつベース重合基質を作成する方法。

83. ベース重合基質は、ポリ(エチレンテレフタレート)、ポリ(ウレタン)、ポリ(スチレン)またはポリ(メチルメタクリレート)、及び水溶性ポリマーは、ポリ(エチレングリコール)、ポリ(エチレンオキシ

ド)、ポリ(ビニルビロリドン)、またはポリ(エチロキサゾリン)である、請求項8-2の方法。

93. 停止溶媒は水である請求項8-2の方法。

94. 停止溶媒は、メタノール、エタノール、アセトン、ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフランまたはベンゼンである、請求項8-2の方法。

95. 停止溶媒は、重合基質及び水溶性重合基質に対し非溶媒であり、最終工程には、請求項9-2に述べた停止溶媒のすすぎが加えられる、請求項8-2の方法。

新書(内容に変更なし)
明細書

望ましい細胞接着効果をもつ表面

これは、1989年9月28日に提出されたユナイテッドステーツ出願番号No. 414,144の一部継続出願である。U.S.政府は、関連の開発内容は、国立科学財团認可C B T - 8 8 1 0 2 0 2 6 8、及び国立衛生研究所認可H L - 3 9 7 1 4により支持されたものとして本発明に権利を有するものである。

望ましい細胞接着効果をもつ表面

本発明の分野は、一般的には、表面への生物特有の細胞の付着に関係する。さらに特性的には、本発明は、細胞付着を促進するために表面の化学修飾と、そこへ共有結合で付着する小さなペプチドに関係する。さらに特徴的であるのは、表面がセラミック、金属またはポリマーからなることであろう。小さなペプチドは、細胞付着を促進し、色々な細胞付着分子に共通している最小の細胞受容体認識アミノ酸配列を含んでいる。本発明の表面及び方法は、かくして、培養基血清組成にも吸着表面タンパク質にも無関係な細胞付着技術に関するものである。

さらに、本発明の分野は、表面を極度に細胞に接着させないようにする溶液加工技術による重合材料の修飾に関する。このような表面は、生体医療及び生物工学の分野で重要な応用性をもっている。さらに、本分野は、細

見出された（5, 6）。

F Nはいくつかのプロテアーゼー抵抗性ドメインから成り、それぞれが他の細胞外分子及び細胞表面と結合する特別な部位をもっている（7）。細胞付着活性は、トリペプチド配列（R G D）に局在化し、いくつかの他のC A M（8）における場合と同様に、F Nの細胞結合ドメインに位置してきた。直接基質に吸着された基質-結合のR G D-含有ペプチド、あるいは、吸着アルブミンまたはIgGに交差結合したペプチドは、繊維芽細胞の付着及び伸展を促進することが発見された。この付着及び伸展活性は、培地に可溶性R G D含有ペプチドを添加することによって容易に阻害されることが発見された（8）。

合成R G D含有ペプチドを利用して特別な溶出と結合した細胞付着-促進F Nフラグメントにおける細胞抽出の親和性クロマトグラフ法により、2つの140 K Dサブユニットをもつ受容体が生成された（9）。哺乳動物F N受容体とその他のR G D指向型受容体は、2つの基質、アルファ及びベーターの典型的な異種二量体である（10）。これらの受容体の科は、同じようなベーターサブユニットのメンバーからなるが、アルファサブユニットは、もっと異なっており、一つまたはいくつかのC A Mに対する受容体の親和性が制限されている（11）。まとめて、これらの構造的また機能的に関係のある受容体科は、インテグリン・スーパーファミリーとし

特表平5-502998 (5)

胞付着型で、またある細胞型には特に付着するが他の細胞型には付着しない特別の利点をもった表面を得るために、これらの付着しない表面に細胞付着ペプチドを付着することに関するものである。

In vivoにおける細胞と細胞外マトリックスとの相互作用は、たとえば細胞成長調節、細胞の移動また分化のような重要な多くの生物過程に含まれる。培養における真核細胞の付着の役割は、特別な細胞培養の努力や試みを大いに成功に導いている。固体物質の付着、伸展及び収縮は、in vitroで細胞に依存する、正常な足場依存性細胞の成長のため予め必要なものである（1, 2）。この細胞の生物付着は、特殊な細胞の型、使用される細胞培養基、培養される細胞の特別な表面を含む色々の要因によって影響される。

多くの哺乳動物細胞は、ポリマー表面で培養される。合成ポリマー表面に付着するほとんどすべての哺乳動物細胞は、吸着されたタンパク質に制御され、受容体へ仲介される。

ある種のトリ及び哺乳動物細胞型の細胞外基質への付着の際に含まれていることが示された最初の細胞付着分子（C A M）は、フィブロネクチン（F N）であった（3, 4）。F Nは、通常血清の付加によって低温不溶性のグロブリン（C Ig）として知られた形態で環境に与えられている。正常な細胞の付着及び伸展が生ずるためには、C Igが培地表面に吸着されなければならないことが

て知られている（12, 13）。

細胞付着の過程の基になっている分子機構の基礎的な理解により、細胞付着を促進するまでの細胞培養基質と他の表面の役割に関して研究が進められてきた。基本的に、タンパク質溶液が培養基質に加えられた後、タンパク質は直ちに表面に吸着される。もし、細胞表面にこれららの吸着されたタンパク質の受容体があり、もしも吸着されたタンパク質の形態が高い配位子-受容体の親和性を破壊する程吸着によって広範囲に変らなければ、培養基質への細胞の付着と細胞の伸展が結果的に生ずるはずである。

もしも、吸着されるタンパク質がない基質上に細胞が種をまかれれば、そこで細胞表面のタンパク質が直接表面に吸着し、もし良い條件が与えられれば、細胞はそれ自体のタンパク質を、細胞外マトリックスを形成している表面へ向けて分泌するだろう。しかしながら、もしも、基質がタンパク質の吸着を支えないか、または、高い親和性のタンパク質の吸着を支えても、細胞-表面受容体がなければ、そこで基質は細胞吸着を支えないだろう。培養基内の細胞は、これらの媒介となる吸着されるタンパク質を経由する以外、どんな場合でも実際に表面に接触することはなかった。

短期間の細胞付着を研究しているある研究者らは、ポリマー表面に特殊なペプチドが吸着されるような細胞付着を促進する基質処理方式の使用を提唱した。たとえば、

Stinger らは、細胞付着を促進するために、ポリマー基質上に、RGD配列を含む13-merペプチドの吸着を提案した(14)。しかしながら、この長さのペプチドは、高温で分解されやすく、また、培養された細胞自体のタンパク質加水分解作用に大いに影響されやすいことが発見された。さらに、表面に吸着されたペプチドは、繰返し使用で脱離されやすくなる。従って長いアミノ酸残基ペプチドと表面の吸着物は不安定であり、再使用できる細胞培養基質を作るには不適当なことが判明した。

細胞付着を促進するもう一方の方法は、タンパク質とペプチドの基質への吸着と付着を容易にするように表面を化学的に修飾する方法である。しかしながら、基質の化学的修飾に関する現在の技術は、特に非特性的でかつ経験的である。たとえば、各種のラジオ周波数プラズマ放出によるポリマー表面処理が、重合化及び非重合化の両方の場合について提案された。表面酸処理または電荷グループの表面融合のような別の方法もまた発表された。しかしながら、これ色々の表面処理は、単に培養表面のタンパク質吸着のパターンを変え、細胞の特徴的な付着と伸展の運動を修飾するために機能しているに過ぎない。従って、タンパク質とペプチド表面の吸着と脱離の問題は依然として残り、処理された培養プレートと他の表面の再使用は制限される。

細胞付着を促進するためのペプチドの表面吸着への別法は、代りに、化学的にペプチドを表面に付着すること

であった。たとえば、ポリマー表面の化学的な修飾方法が、Brandleyらによって用いられ(1988)(Analyst. Biochem. 172: 270)、彼等は、細胞付着を促進するためにポリマー基質に9-merのペプチドの封入を提案した(1d.)。強化された細胞付着は、Brandley技術を用いて達成されたが、この方法は、吸着されたペプチド系に観察される細胞付着の程度を同じように促進するために、同じ濃度のペプチドを必要とした。たとえば、Brandleyの図1は、1平方センチメートル当たり平均およそ6ナノモルのペプチドの表面濃度を示す(Brandley, P., 275)。これらの高いペプチド濃度は、Brandley法が単にポリマー表面へのペプチドの封入を制御しないばかりでなく、ポリマーのバルクにペプチドを結合させてしまうことが示唆される。この合成ペプチドの値がグラム当たりおよそ5,000\\$ということなので、この方法は実用的に、細胞培養基質の経済的製造法を助長することにはならないだろう。

そこで、繰返し使用による脱離現象や細胞除去のため添加される細胞プロテアーゼまたはプロテアーゼによるタンパク質の加水分解に抵抗する特性を促進し、熱に安定な、細胞付着でペプチドを被覆した表面を製造する経済的な技術の必要性が依然として存在している。より商業的に実用化可能で経済的な系は、細胞培養とポリマー化学の分野で、Brandley及びその他の人々により提案された技術よりも本質的に、よりペプチドの効率的な方法

になるだろう。

血液接触を含めて、現在使用されている特許申請中の生体医療ポリマーは、小さな径の血管移植片に有用であるべき十分な血栓非形成性が証明されなかった。血小板及びその他の血液細胞の付着が、小径移植片が普及しない主要な原因であり、現在の具体的な状況は、血液成分と生体医療ポリマーの相互作用を減少することである。血小板、白血球細胞、纖維芽細胞などの付着は、タンパク質のポリマー表面への吸着が媒介となつてもたらされるので、これらのポリマーとタンパク質交互作用を少なくする方策が取り上げられた。

ポリエチレンオキシド(PEO)表面は、それらの強い親水性、鎖移動度及びイオン荷電の欠除の結果として、血漿タンパク質の吸着に抵抗することが観察された。いくつかのグループが、生物適合性または非付着性表面を得るための摸索を行い、修飾剤として、PEOまたはPEG(ポリエチレングリコール)を利用した。PEOでポリマー表面を修飾するために異なった研究方法が用いられた。それらの中には、たとえばPET、ポリウレタンまたはポリビニルアルコールのようなベースポリマーへのPEOの共有架橋結合、附属のPEO連鎖をもつモノマーの重合、ブロック共重合による塩基ポリマーへのPEOの結合、あるいは、ブロックの1つがPEOであるABまたはABA型の典型的なブロック共重合のPEO-含有界面活性剤の直接吸着などの技術が含まれ

ている。これらの技術の大部分は、比較的低分子量(5,000ドルトン以下)のPEOを用い、ほんのわずかが、著しく高い分子量を用いた。

上記の技術のあるものは、修飾したポリマーの表面で細胞の相互作用を少なくするのに合理的に作用したが、大部分のものは必要な表面修飾を得るために何段階も必要とした。さらに、それらはベースポリマー表面における不安定な化学成分の構造と利用度によって限定され、多くの場合、ベースポリマーの修飾には特異的である。

本発明は、PEO及びその他の水溶性ポリマー(WSP)を、ベースポリマー(B, P.)の表面に結合させる技術に関する。

特許明細書全般に、次の略字が出願人によって用いられる:

A	= Ala (アラニン)
C	= Cys (システイン)
D	= Asp (アスパラギン酸)
E	= Glu (グルタミン酸)
F	= Phe (フェニルアラニン)
G	= Gly (グリシン)
I	= Ile (イソロイシン)
K	= Lys (リシン)
P	= Pro (プロリン)
R	= Arg (アルギニン)
S	= Ser (セリン)

特表平5-502998 (7)

V = Val (バリン)	PEG = ポリエチレングリコール
Y = Tyr (チロシン)	P E L L = ポリウレタン (ペレタン)
B P = ベースポリマー	P E O = ポリエチレンオキシド
C A N = 細胞付着分子	P E O X = ポリエチロキサブリン
C F N = 細胞フィプロネクチン	P E T = ポリエチレンテレフタレート
C i g = 低温-不溶性グロブリン	P F N = 血漿フィプロネクチン
D I F W = イオン交換濾過水	P H E M A = ポリ (ヒドロキシエチルメタアクリレート)
F C = フォカルコンタクト	P I P N = 物理的に内部に入り込んだネットワーク
F E P = 弗化エチレンポリマー	P I t = ヒト血小板
f g = フィブリノーゲン	P M M A = ポリメチルメタアクリレート
F N = フィブロネクチン	P r e s t i m P l t = 5 μ mアデノシンジホスフェートにより予め刺激されたヒト血小板
G R E D V = グリシン、アルギニン、グルタミン酸、アスパラギン酸、バリンまたはGly-Arg-Glu-Asp-Val	P T T E = ポリ (テトラフロロエチレン)
G R G D = アミノ酸配列グリシン、アルギニン、グリシン、アスパラギン酸; またはGly-Arg-Gly-Asp	P V P = ポリビニルビロリドン
H F F = ヒト包皮織維芽細胞	R E D V = アルギニン、グルタミン酸、アスパラギン酸、バリンまたはArg-Gly-Asp-Val
H V S M C = ヒト血管平滑筋細胞	R G D = アミノ酸配列アルギニン、グリシン、アスパラギン酸、またはArg-Gly-Asp
K D = キロドルトン	S A M = 表面 (または基質) 付着分子
mer = アミノ酸残基	T F A A = トリフロロ酢酸
nm = ナノモル	T H F = テトラヒドロフラン
P A E = ブタ大動脈内皮 (細胞)	μ g = マイクログラム
P B S = リン酸緩衝溶液	μ l = マイクロリットル
P D M S = ポリ (ジメチルシリコサン)	

W S P = 水溶性ポリマー

Y I G S R = チロシン、イソロイシン、グリシン、セリン、アルギニン、またはTyr-Ile-Gly-Ser-Arg

本発明は、細胞付着を仲介する受容体の量を促進し、程度を強化する、タンパク質加水分解に対し安定で再使用できる表面を生産するように表面を修飾する新しい方法を特徴とする。ここに開示される、特に方向性をもち、制御された化学的方法は、処理される材料の大きさ全体にペプチドを拡散することなく、フラスコまたはその他の装置の表面におけるペプチドの化学的な付着方法を提供する。ここに、明らかにされる方法は、驚くべきことに、以前に提案された方法によって要求されるペプチドのはんの1部分の使用で表面への細胞付着を強化促進する。ペプチドは、化学的に表面に付着し、これによって、これまで悩まされてきた表面ペプチド吸着系の脱離問題を避けることができる。これらの利点は、基質のはんの表面に、たとえば12アミノ酸残基より小さなペプチドの化学的な付着によって達成される。

本発明につけ加えられる特徴は、本方法が全表面付着分子 (SAM) タンパク質ではなくて、細胞付着分子断片を使用する点にある。かしら文字語SAM及びCAMを、表面、基質または細胞付着分子を表すため交互に用いているが、これらは、特別な結合領域で細胞外マトリクス成分と交互に作用し、細胞受容体 (すなわち細胞)

の特別な領域媒介型付着を促進する。SAMは、フィブロネクチン、ビブロネクチン、スロンボスボンジン、ラミニン及びその他のタンパク質を含むタンパク質の群である。微小ペプチド断片の移植は、より一層の利点を表面にもたらし、全タンパク質またはより大きなペプチドで移植された表面よりも、変性やタンパク質の加水分解の問題が少なくなる。

本発明のさらに特徴とする点は、より効率的な表面修飾系を与えることである。たとえば、申請者らは、正式に提案された化学移植法によるペプチドの量のわずか500分の1を使用して最大の細胞付着性を備えた表面を生産することができる。たとえば、Brandleyらは、平均6ナノモル/ cm^2 (6,000ピコモル/ cm^2) のペプチド表面濃度による生産方法を用いた (Brandley et al., pg. 274、表1)。逆に、申請者らは、表面ペプチド濃度0.001ナノモル/ cm^2 以下 (600万倍の改良) で細胞付着の強化が表示された。申請者らは、ペプチドを表面に化学的に結合する過程で、表面ペプチドの著しい量を省略することができ、細胞付着促進活性面で損失なく達成することができた。

明らかにされた表面修飾技術のさらに追加される特徴は、吸着された血清成分と独立に、受容体-媒介型細胞付着を促進する新らしい方法を提供する点にある。本発明は、たとえば、豚、鼠、ヒトの細胞を含めてどのような属や型の細胞の付着の促進にも有効な表面処理の方法

特表平5-502998 (8)

を提供する。処理表面に培養がすでに成功した細胞の型は、大動脈：包皮の纖維芽細胞及び3T3 纖維芽細胞（ATCC # CRL 1658）及び血管内皮細胞を含んでいる。

本発明はまた、広範囲の各種の小ペプチドの使用の適応性を特徴とする。本発明に関連して数多くの小ペプチドを使用することができるが、最も好ましい小ペプチドは、12アミノ酸残基（12mer）以下のものを含む。さらに好ましくは、これらのペプチドが3-9アミノ酸残基（3-9mer）を含むことである。最も好ましいペプチドは、6アミノ酸残基（6mer）かまたは4アミノ酸残基（4mer）である。ペプチド内のアミノ酸残基の数は、ここではしばしば、このような用語（たとえば、6mer、4mer等）で表示される。

これらの小ペプチドは、さらに、最小細胞表面受容体認識配列を含めて、たとえば、RGD、YIGSRまたはREDVのように記述される。この配列が、処理表面に細胞が支えられるよう細胞受容体に伝達させている。例として、最小細胞表面受容体認識配列を含む好ましいペプチドは；GRGD（Gly-Arg-Gly-Asp）、GYIGSRY（Gly-Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-Tyr）、GYIGSR（Gly-Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg）、CRGDY（Gly-Arg-Gly-Asp-Tyr）、YIGSR（Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg）、RGD（Gly-Arg-Asp）、REDV（Arg-Glu-

Asp-Val）、GREDV（Gly-Arg-Glu-Asp-Val）、GREDVY（Gly-Arg-Glu-Asp-Val-Tyr）、RGDS（Arg-Gly-Asp-Ser）、RGDS（Gly-Arg-Gly-Asp-Ser）、RGDF（Arg-Gly-Asp-Phe）、RGDF（Gly-Arg-Gly-Asp-Phe）、PDSGR（Pro-Asp-Ser-Gly-Arg）、PDGSR（Gly-Pro-Asp-Ser-Gly-Arg）、GPDSGR（Gly-Pro-Asp-Ser-Gly-Arg-Tyr）、IKVAVC（Ile-Lys-Val-Ala-Val-Cys）、GIKVAV（Gly-Ile-Lys-Val-Ala-Val）、IKVAVY（Ile-Lys-Val-Ala-Val-Tyr）、GIKVAVY（Gly-Ile-Lys-Val-Ala-Val-Tyr）アミノ酸配列を含んでいる。これらの断片は、多くの表面付着分子の細胞付着配列（RGD）か、または、ラミニンの細胞付着配列（YIGSR及びPDGSR）、特殊な表面付着タンパク質、または細胞付着分子フィロネクチン（REDV）を含んでいる。ラミニンからのIKVAVペプチドもまた、特別な細胞にとって有用である。これらの最も好ましいペプチドとしてさらに、標識ヨウ素化用のC末端Yが含まれる。N末端Gは、付着ペプチドと表面の間の特別なペプチドのスペーサーとして用いられる。小ペプチドは、処理表面の細胞付着に必要な、細胞受容体認識部位を与えるのに使用される。

少なくとも0.001ピコモル/cm²のペプチドの表面濃度が、表面の細胞付着特性を強化するのに十分であるが、好ましいペプチド表面濃度の範囲は、およそ0.001から100ピコモル/cm²である。より好ましいペプチド表面濃度の範囲は、0.5から2.0ピコモル/cm²である。本発明の最も好ましいペプチド表面濃度はおよそ1.2ピコモル/cm²である。

通常の方法は、CAMまたはペプチドの、表面への直接吸着か、あるいは非-CAMタンパク質の吸着後、吸着タンパク質へのペプチドの交差連結に頼っており、従ってこれらの成分の培養基中への脱離を余儀なくされた。本発明は、望んだ基質の水酸基または他の反応成分へペプチドが共有結合で化学的に結合することにより、このタンパク質脱離の問題を避ける一層の利点を与えている。

生体医療的移植の使用には多くの立場がみられるが、望ましいのは、組織内の周囲の細胞が移植表面に付着して広がる（組み込まれて）ことである。本発明は、宿主内にこのように望ましい移植の組込みを可能にする表面修飾の方法を提供する。本発明はさらに、in vivoの移植に随伴する生体医療用具の感染の発生を減少する方法を特徴としている。生体医療用具の移植に関係した主なリスクは感染であった。用具と生物組織間の連続的な保護層の欠陥からバクテリアその他の伝染剤に組織内部への侵入の機会を与える。用具の一部として、強化された細胞付着促進表面によって、連続的な保護細胞被覆材が

与えられ、伝染源の侵入の可能性をなくして、このような望ましくない副作用は最少限に抑えられるだろう。

さらに、生体医療的移植の使用には、周囲の組織から特別な細胞だけが移植表面に付着するような状態が多くみられる。たとえば、血管移植技術で、内皮細胞が移植に付着し、内皮細胞に並んで、自然の血管壁のように見えることが望ましい。しかしながら、血小板もまた付着して凝固するようになり、纖維芽細胞と平滑筋細胞もまた、組織から浸潤し、血管移植内に極めて有害な厚い組織層を形成するようになる。そこで、血小板は付着させず、内皮細胞だけを付着させる材料を使用できれば好都合である。本発明は、ペプチドの細胞への吸着による驚くべき利点として、細胞一型特異性の特徴を与える。

さらに加えて、開示された表面処理方法による長期の安定性は、長期間の身体定置において、各種の生体医療的移植の製造上理想的である。たとえば、神経成長因子及び内在カテーテルなど。本発明の表面修飾系はまた、哺乳動物細胞生体反応器のデザインに新しい手段を与える。すなわち、それは、媒質CAMとは独立に細胞付着を支える安定した必須表面成分を与えるからである。このような基質は、細胞付着分子に欠けている無血清培地の使用を可能にして、一層の利点を与えるものである。

本発明の薬品は、表面水酸基成分または、このような成分を附加できる他の表面反応成分をもつつかなる材料にも直接適用できる。細胞付着を強化するほとんどの他

特表平5-502998 (9)

の表面処理は、タンパク質の吸着の強化によって行われている。本発明のペプチド移植方法は、細胞が、表面一
共役合成ペプチドとして受容体をもつので、吸収される
タンパク質の必要性は完全になくなる。これらの共有的
に結合した最少の配列は、脱離がなくなり、活性群（た
とえばRGD、YIGSR、PDSGR、IKVAVまたはREDV配列）
が可溶性プロテアーゼにさらされないために、吸着した細胞付着タンパク質または付着ペプ
チドに結合した吸着タンパク質よりも、細胞タンパク質
の加水分解及び熱分解に対してはるかに安定である。

本表面を製造する色々な化学的方法があるけれども、
各種の方法は、表面活性化の一般的な方法、すなわちア
ミンまたは水酸基のような求核試薬のペプチドへの共役
による修飾経由、アミンまたは水酸基またはチオール
(23) 経由になる。例としては、表面水酸基群の活
性化は、たとえば塩化トレシル、グルタルアルデヒド、塩
化シアヌル、塩化スルホニル、臭化シアンによる処理で
達成されるだろう。また、表面水酸基は、ジメチルスル
ホキシド中のターシャリーブトキシドカリウムとベン
ゾイン経由で加えられるだろう。これらの特別な表面活
性剤による処理後ペプチドが水酸基群に共有的に連結さ
れる。さらに、本発明は、たとえば無水コハク酸のよう
な活性カルボキシル群を用いても行うことができる。曝
露された表面はそれから洗浄し、ペプチドで結合される。

本表面ペプチド処理の参入で有利になるであろう生体

の水分をもつゲル状からなり、本発明の開示前には、細
胞付着を支持できなかった。

他の高含水ポリアクリラミドゲル混合物との連絡に
ペプチドを用いた場合は、低含水ポリマーと比較してペ
プチドの有効性は極めて低い。高い水和性ゲルは、ペ
プチドの滲透性が高く、従って、小さなペプチドはポリマー
のバルクの中に本質的な見境のない拡散がしやすくなっている。
これらの高い水和性ポリマーは、非常に大きな分子をもつ全タンパク質にさえ透過性を示して、タンパク質電気泳動に用いられてきた(21)。ポリアクリ
ラミドからなるポリマーゲルは、通常少なくともおよそ90%の水を含み、従って、本発明の適用には不適
当であろう。

本発明の他の好ましい具体例は、特別なセラミック、
グリコフェーズグラス（グリセロルプロビルシランの結
合したガラス）の誘導を指向している。例として、本法
で用いられた好ましい金属はチタニウムである。

本発明はまた、最初に表面を活性化し、ペプチドを活
性化表面に共役結合し、それからペプチドが誘導された
表面に哺乳動物の細胞を置き、そこで好ましいペプチド
は12merよりも小さいことからなる、表面への細胞付
着を強化する方法を含む。ペプチドが活性化された表面
に共役結合される工程は、最も好ましくは、上に述べた
(細胞付着特性をもつ)ペプチドの十分な量を含む溶液
に活性化された表面を曝露することからなる。すくなく

医療的移植の例としては、陰茎、心臓、腫、股関節部の
移植；カテーテル；人工静脈または動脈、人工腱及び、
韧带；人工骨ねじ、骨板、骨片及び骨関節；人工皮膚；
神経成長カイド；及び眼内のレンズ及び類似品を含む。
この表面ペプチド処理を利用してできる細胞及び組織培養基
に用の材料の例としては、培養フラスコ、ベトリ皿、微
粒子担体ビーズ、ポーラス大粒子担体、繊維、穴あき繊
維、單一材料からなる支持体、及び回転瓶が含まれる。

開示した方法は、強化された細胞付着が望まれるすべ
ての表面の誘導に使用することができる。例としては、
またそれに限定されないが、これらの表面として、金属、
セラミックまたはポリマー表面を含む。発明の好ましい
具体例は、ポリマー表面の誘導に向かわれる。提案した
方法を用いてどのようなポリマー表面も誘導されるだろ
うが、特に好適な好ましいポリマー表面として、ポリ
(ヒドロキシエチルメタクリレート) (PHEMA)、
ポリ(エチレンテレフタレート) (PET)、ポリ(ジ
メチルシロキサン) (PDMS) 及び他のシリコンラバ
ー表面が含まれる。PET、さもなければダクロンとし
て知られる、は生体医療用移植にしばしば用いられるポ
リエステルである。PTFEは別にテフロンとして知ら
れる。本発明の最も好ましいポリマーマトリックスはポ
リ(ヒドロキシエチルメタクリレート) (PHEMA)
から成る。

PHEMAポリメリックマトリックスは、およそ45%

ともおよそ10ng/mlのペプチドの溶液の濃度であれば、
この結合工程では同じ結果を生ずるだろうが、およそ
10ng/mlと100μg/mlの間のペプチドの溶液がま
た適当である。最も好ましくは、本プロセスが、10ng
/mlペプチドの濃度をもつペプチド溶液を含むことである。
本発明の好ましい具体例の一つとして、ペプチド溶
液のペプチドはアミノ酸配列アルギニン-グリシン-ア
スパラギン(RGD)を含む。本発明の他の好ましい具
体例として、ペプチド溶液のペプチドは、YIGSRを
含む。本発明のさらに好ましい具体例では、ペプチド溶
液のペプチドは、PDGGR、IKVAV、REDVまたは
RGDFを含む。本発明の方法で用いられるべき最
も好ましいペプチドはGRGD、RGDY、RGDY、
GYIGSR、GYIGSRY、YIGSR、RGDS、
REDV、GREDV、GREDVY、RGDF、
GRGDF、PDGGR、GPDSGR、GPDSGR
Y、IKVAV、GIKVAV、IKVAVY、及
GIKVAVYからなる群から選ばれたペプチド配列か
らなる。これらのペプチドは、たとえばPETポリマー
及びPHEMAポリマーのようなポリマー表面、または
グリコフェーズグラスのようなガラス表面への誘導に最
も好ましく用いられる。しかしながら、細胞受容体認識
を支える能力のあるアミノ酸配列を含むなどのペプチドも、
本発明の結合に用いられるだろう。

細胞付着を強化するための生物活性細胞付着ペプチド

特表平5-502998 (10)

移植方法の申請は、次の使用方法を含む。

1. 足場依存性細胞及び細胞系の実験室規模の組織及び細胞培養として。この方法は、細胞培養基質として用いられる実験室ガラス製品及びプラスチック製品、たとえば組織培養フラスコ及びペトリ皿の処理に有益であろう。それは、付着にすべて本質的には同じ分子生態学を利用して、動物、昆虫そして植物細胞そして組織に有益であろう。

2. 大規模な組織及び培養細胞として。

本法は、微粒子担体、ポーラスな大粒子担体、穴あき繊維、単一の材料からなる支持体及び回転瓶の処理に有益であろう。

3. これら表面の内皮化を促進するため、うめこめられる人工血管移植の内部用として、

4. 組織内の融和を促進するため、移植血管の外部と吻合部分（末端）のために

5. 組織との融和が望まれるその他の移植用具として、たとえば、人工腱、韌帯、骨ねじ及び板、骨片、関節及び皮膚、

6. 付着及び組織への融和を促進する縫合の処理として。

7. 細胞または組織の方向性をもった生長または移動の促進のために、本法は、表面濃度に勾配のある表面へペプチドが移植される時に有益であろう。これが有用な例は、末梢神経再生用の神経成長ガイドの場合である。

8. 研究用として。本系は、タンパク質吸着の影響の混

乱なしに、血清の存在下で細胞付着の試験が可能である。そこで、試験系におけるバックグラウンドのレベルが低くなる。さらに、本法は、表面に共役結合するペプチドの量を調節し、これはまた、細胞付着の試験で重要である。

本発明によって作られた細胞付着に抵抗するように修飾された表面は有用であろう：

1. 細胞付着が有害であるような生体医学の立場、たとえば、カテーテル、血液透析膜、血液濾過器、眼内レンズ、コクタクトレンズ、及び

2. タンパク質吸着が有害であるような生物工学における立場、たとえば、クロマトグラフィー支持カラム。

図1は、求電子性芳香族置換経由でのPETフィルムのヒドロキシメチレーションを示す。反応は、室温で、18.5%ホルムアルデヒド(V/V)及び1M酢酸によって行われた。

図2は、ヒドロキシメチル化PETフィルムへのトレシル活性化とGRGD共役結合を示す。

図3は、(a) GRGD共役結合上の及び(b)無処理のPETフィルム上の付着と伸展した3T3繊維芽細胞を示す。

図4は、無血清培養基中のGRGD共役結合及び無処理のPHEMAフィルム上の3T3繊維芽細胞の伸展を示す。

図5は、GRGD共役結合PET(実線カーブ、白箱型マーク)対GRGD吸着PET(破線カーブ、黒菱形

マーク)及び無処理PET(点-破線カーブ、白箱形マーク)における3T3伸展の比較を示す。

図6は、無血清及び完全培地における修飾した(実線棒)及び非修飾(破線棒)フィルム上の3T3伸展の量を示す。細胞伸展の程度は、各フィルム上で接種2時間後に測定された。細胞は、10,000細胞/cm²の密度で植えつけられた。

図7は、無血清培養基内で、PETフィルムに誘導されたGRGD上の3T3細胞の伸展に対する可溶性RGDの効果を示す。細胞はフィルムへの植えつけ前RGDSにより30分間予備培養された。細胞付着の程度は、植えつけ3時間後に測定された。RGDSで予備培養された細胞(破線棒)。無処理対照細胞(実線棒)。

図8は、誘導GRGD上(白、四角)及び無処理(黒、菱形)PET表面の3T3細胞の増殖運動を示す。これらの試験は完全培地で行われた。

図9は、結合緩衝液(0.2M重炭酸ソーダpH1.0)に加えられたグリコフェーズガラスに移植され、トレシル活性化ガラス上、室温で培養されたGRGDY-¹²⁵Iの表面濃度を示す。投入した濃度は、ガラス表面の単位面積当たり可溶性ペプチドが反応に利用することができた。表面濃度は、ガラスの単位面積当たり、結合するペプチドのモルとして定められ、ガンマ計測器内でガラス試料が洗浄され、標識ペプチドを基に値が計算された。各点は、三回測定表面濃度の平均であり、ブロード濃度は12.1

picomoles/cm²であった。

図10は、GRGDYによるグリコフェーズガラス上のHFF細胞面積の集積ヒストグラムを示す。細胞は、アルブミン(C)、(D)を含む完全培地(A)のどちらかに懸濁され、基質上に植えつけられた。A及びCは、RGD-誘導ガラスに集められたデータを表し、一方(B)及び(C)は、非付着対象表面を表す。個別の細胞の面積は、デジタル画像解析装置に連結したビデオ顕微鏡によって測定された。細胞伸展が血清のない場合でさえ、ペプチド結合表面に観察され；血清が存在してさえ、非結合表面には細胞伸展がみられず；そしてこれらの細胞の大部分は付着されなかった。積算データをとるために各時間点で少なくとも100細胞が分析された。

線：(実線) 15分：

線：(実線) 15分；(点線) 30分；(重ダッシュ線) 60分；及び(軽ダッシュ線) 120分。

各時間毎の上50%及び下50%の中間点(順次)：
A: 1.5分、2.65 μm²; 3.0分、9.06 μm²; 6.0分、11.13 μm²; 12.0分、21.30 μm²; B: 3.85, 3.97, 4.48, 4.53; C: 2.48, 9.50, 8.64, 12.07; D: 3.77, 3.25, 3.88, 3.88.

図11は、G D G D Y-誘導のグリコフェーズガラス(白四角)及び10%ウシ胎児血清を補足したDMEM中の無処理シリケートガラス(黒四角)上のHFFの増殖を示す。細胞は100×位相差顕微鏡で可視化さ

れた。増殖表面の単位面積当たりの細胞数は、時間点当たり 10 視野の試料サイズから、視野面積当たりの平均細胞数を基に計算された。同じような増殖速度であることは、細胞がペプチド結合表面から集められ、その後分けられる事を示している。

図 12 は、GYIGSR-Y で誘導されたゲリコフェーズガラス上の HFF の細胞面積を示すヒストグラムの集積図である。細胞は完全培地 (A), (B), またはアルブミン含有の無血清培地 (C) (D) のどれかに懸濁され、基質に植えつけられた。(A) 及び (C) は、YIGSR-誘導ガラスに集められたデータを示し、一方、(B) 及び (D) は、非付着対照表面上で集められたデータを表している。個別の細胞の面積は、デジタル画像解析装置に連結した位相差ビデオ顕微鏡で観察された (12)。細胞伸展は、血清のない場合でさえ、ペプチド結合表面に観察され；血清があっても非結合表面での細胞伸展はみられず、かつこれらの細胞は付着されていなかった。(集積データを求めるため各時間点において少なくとも 100 細胞を分析した)。

線：(実線) 0 時間：(点線) : A : 0 時間、500 μm^2 ; 3 時間、2200 μm^2 ; 6 時間、2333 μm^2 ; 9 時間、3375 μm^2 ; B : 340, 520, 486, 517; C : 517, 1045, 1033, 1400; D : 245, 306, 362, 514.

図 13 は、RGD-結合ガラス上の伸展 HFF の位相

差 (13A, C) と IBM (13B, D) の顕微鏡写真を示す。細胞は、無血清培地 (13A, B) で、または完全培地 (13C, D) で 4 時間培養された。スケール棒 = 10 μm .

図 14 は、YIGSR-結合ガラス上の伸展 HFF の位相差 (14A, C) と IRM (14B, D) 顕微鏡写真を示す。細胞は、無血清培地 (14A, B) または完全培地 (14C, D) で 8 時間培養された。スケール棒 = 10 μm .

図 15 は、F-アクチンで染色された HFF のけい光顕微鏡写真を示す。HFF は無血清培地 (15A) と完全培地 (15B) の RGD-誘導基質上で 4 時間培養された。15C と 15D は、無血清培地 (C) と完全 (D) 培地で 8 時間培養後 YIGSR-誘導基質上の伸展細胞である。スケール棒 = 10 μm .

図 16 は、PET または GRCG ベプチド誘導の PET 表面のどちらかに樹立された細胞培養基に伸展しつつあるブタ大動脈内皮細胞に関する血清の存在、非存在の影響を示す。

図 17 は、ベプチド誘導 PET (ポリマー) 表面对無処理 PET (ポリマー) 表面上に観察された細胞伸展の速度を示す。

図 18 は、細胞伸展 (HFF) における RGD-ペプチドの密度の影響を示す。

図 19 は、物理的に内部に入り込んだネットワーク

(PIP N) の提案された表面構造の模型図である。

図 20 は、修飾ポリマー表面への血小板付着の *in vitro* のオンライン可視化方式の連続装置の分解図である。

図 21 は、修飾 PET 表面への 11¹³ アルブミン吸着を示し、PEO 18500 で修飾された表面への吸着が僅かなことを示している。

図 22 は、けい光ビデオ顕微鏡で得られた PET PIP N の血小板付着を示す。100% の対照地は、ポリマー表面の 4.625 血小板 / 1000 μm^2 に相当する。

図 23 は、培養 30 日以上の PET PIP N 上の細胞伸展解析を示す。細胞は 30000/cm² の濃度で植えつけられた。PEO 18500 修飾表面は最初の植えつけ後 9 日目及び 15 日目に再度植えつけられた。

図 24 は、ペレテン PIP N's 上の細胞伸展解析を示す。細胞は 70000/cm² の濃度で植えつけられた。これらの表面は単に PEO 18500 のみで修飾された。括弧内の数字は、修飾に用いた THF の力値を示す。

図 25 は、PMMA PIP N's での細胞伸展の解析を示す。細胞は 70000/cm² の濃度で植えつけられた。これらの表面は PEO 18500 のみで修飾された。括弧内の数字は修飾過程で用いられたアセトンの力値を示す。

本発明は独自の自己付着性の性質をもつ表面、及びペプチドと可溶性培地成分が、別々に無関係に吸着されて、

細胞-表面付着性が特に強化された処理表面が製造される、その方法に関係している。この方法は、培養系の最適化を単純化し、また各種の材料表面に付着させる細胞の量と割合を制御する各種の型の基質を製造する技術を提供する。さらに、特別な細胞非付着性をもつ材料と、細胞付着とタンパク質吸着を減少するような表面を製造する方法が開示される。これらの材料は、非付着性表面として重要な用途がありまた付着促進ペプチドで修飾すれば特別な利点をもちうる。

さらに特別に、表面修飾技術は、表面にペプチドを化学的に結合することを特徴とし、そのペプチドは、細胞(表面)付着分子内に含まれる少なくとも最小のアミノ酸配列からなり、たとえば、フィプロネクチンの中の RGD、あるいはラミニンの中の YIGSR、IKVAV または PDSGR であり、フィプロネクチンのある形の中の REDV であり、あるいはまた細胞表面または細胞-細胞付着に含まれるタンパク質の配列に関係するまたはそれから引き出されたいくつかの他の短いペプチド配列である。“細胞付着分子” (CAM) 及び“基質付着分子” (SAM) の言葉は、細胞受容体の仲介付着または表面付着を容易にすることが発見されたタンパク質とペプチドの科を述べる際に交換して用いられる。

この表面処理方法は、反応群に曝露する表面を化学的に活性化し、活性化された表面を水洗し、次に、小さな

特表平5-502998 (12)

ペプチド、たとえば、RGD, RDGR, IKVAV, YIGSR, REDV、または全部で12アミノ酸残基(12mer)より少なくて受容体仲介の細胞付着を容易にする他のアミノ酸配列を含む溶液に表面を曝露することからなる。処理される表面の反応成分に、ペプチドの末端基が共有化学的に結合する。反応グループに曝露するために表面を活性化する色々な化学的方法がある。これらの方の1つはトレシル活性化法である。本発明の実施に用いられる他の化学方法の例には以下のものが含まれる。

(1) ゲルタルアルデヒドによる表面活性：

0°Cから80°Cの間で、5%から37%のゲルタルアルデヒドの水溶液でおよそ1時間表面を処理する。ゲルタルアルデヒドは、曝露された求核性群、たとえばアミン及び水酸基と共有結合するだろう。表面を水洗後、10ng/mlと1mg/mlの間のペプチド溶液で表面を処理する。ペプチド上の求核性群、たとえばチオール、アミン及び水酸基は、表面-結合ゲルタルアルデヒド機能に結合するだろう。

(2) 塩化シアヌルによる表面活性：

0°Cと80°Cの間で、およそ5%の塩化シアヌルの非水溶液で表面を約1時間処理する。塩化シアヌルは、曝露された求核性群たとえばアミン及び水酸基と結合するだろう。表面を乾燥溶媒で洗い、次に、非水溶媒、たとえばアセトニトリル中のペプチド濃度が10ng/mlと1

mg/mlの間のペプチド溶液で表面を処理する。ペプチド上の求核性群、たとえばチオール、アミン及び水酸基のどれでも表面-結合塩化シアヌル機能に結合するだろう。

(3) 他の塩化スルホニルによる表面活性：

塩化トリルのような塩化スルホニルの他の物質を使って、例3の概略の方法に準ずる。

(4) 奧化シアンによる表面の活性化法：

20°C以下で、pH1.0-1.1の奥化シアン水溶液におよそ1時間表面を曝露する。奥化シアンは共有的に結合し、表面の水酸基群を活性化する。表面をpH1.0-1.1で水洗し、同じ溶液で濃度が10ng/mlと1mg/mlの間のペプチド溶液で約1時間処理してペプチドを結合させる。ペプチドは、ペプチド上のアミン機能により奥化シアン群と結合する。

(5) 活性カルボニル関係エステルを生産するための表面の活性化、たとえば無水こはく酸：

約20°C温度で、無水こはく酸溶液に表面を曝露する、そこでこの化合物は、表面の水酸基及びアミンと反応し、それぞれエステルとアミドを生成する。表面を洗い、10ng/mlと1mg/mlの間のペプチド溶液と1時間処理して結合する。ペプチドは、アミンまたは水酸基群経由で活性化した表面と反応するだろう。

(6) ベンゾインジメチルスルホキシドを用い、水酸基が添加されるポリマーの予備活性化：

水酸基の機能は、ポリ(テトラフルオロエチレン)

(PTFE)に添加されることが、Costello及びMcCarthyのポリ(テトラフルオロエチレン)に対する特殊機能の表面-選択的導入、Macromolecules 20: 2819-2828 (1987) に述べられている。ターシャルブトキシドカリウムのジメチルスルホキシド溶液にベンゾインを添加し、PTFE表面が接触するよう置かれる。反応は50°C、1時間で進行する。材料を取り出でテトラヒドロフラン(THF)で洗浄する。この中間体の表面は次にTHF中の1Mのボランにより室温で12時間処理される。次にその表面は、10%過酸化水素を含む1Mの苛性ソーダにより0°Cで3時間処理され、その後稀釀苛性ソーダ、水、稀釀塩酸、水、THF及びヘプタンで逐次洗浄する。これによって水酸基の豊富な表面が生じ、上に述べた化学物質のどれによってもこの後活性化させられる。

ペプチドを表面に付着させる最も好ましい方法は、Nilsson及びMosbach(1981)によって述べられたように(Biochem. Biophys. Res. Commun. 102: 449-457)、トレシル固定化法による、表面の表面活性化からなる。特に、トレシイ活性化法は、およそ4.0μlの2,2'-トリフルオロエタンスルホニルクロライド(塩化トレシル)及びおよそ2mlのトリエチルアミンを含む20mlの乾燥エーテル中に、室温で約1.5分間表面を沈めることから始められる。これらの活性化された表面は次に、0.2M重炭酸ソーダ、pH1.0の

緩衝液で洗浄された。次いで表面は、およそ60-100ng/mlのペプチドを含む同じ緩衝液中で室温で約20時間おかれた。最も好ましくは、ペプチド溶液の濃度はおよそ10ng/mlである。この培養時間は表面の水酸基群とペプチドの結合に必要である。

本発明のこの特別な具体例は、GRGDペプチドによって良好な状態で用いられている。

望まれる適量のペプチドを含む溶液に、活性化した表面をさらすことによって、ペプチドは最も好ましい状態で活性化表面に結合する。少なくともおよそ10ng/mlのペプチド溶液の濃度であれば、同じ様に満足な結果が得られるだろうが、およそ10ng/mlペプチドと100μg/mlペプチドの間のペプチド溶液が好ましく、およそ10ng/mlのペプチド溶液が結合プロセスに用いられるのが最も好ましい。

開示された方法により生産される処理表面は、少なくとも0.001 picomoles/cm²のペプチドの表面濃度によって特徴づけられる。少なくとも0.001 picomoles/cm²のペプチドの表面濃度は、表面の細胞付着特性を強化するには十分であると期待される。より好ましいペプチド表面濃度の範囲は、およそ0.5から100 picomoles/cm²の間である。最も好ましい範囲のペプチドの表面濃度は、およそ0.5から20 picomoles/cm²の間である。最も好ましい表面ペプチド濃度はおよそ12 picomoles/cm²である。

処理されるべき表面に、表面水酸基成分が存在しない場合は、表面は前処理が行われた。この前処理法は、好ましくは、ヒドロキシアルキル群を表面に加えるために、求電子性芳香族の置換が用いられる表面ヒドロキシル化の方法からなる。

この前処理法の特に好ましい方法は、表面を約18.5% (V/V) のホルムアルデヒド溶液 / 1M の酢酸に室温で約4時間沈めることからなる。この方法は、本発明の特別に好ましい具体的な例として、PETポリマー表面からなるハイドロキシメチレーションの中で用いられた。ヒドロキシメチル化された表面は、それから、上で述べたようにペプチドの付着によりトレシル活性化がなされた。最も好ましいものとしてここに開示された前処理法は、GRGDまたはGYIGSRペプチドにより、ポリマー表面、特にPETポリマー表面を作るのに用いられる。色々な他の表面ヒドロキシル化法は、他のポリマーまたは物質と結合して使用すれば同じように有用である。

色々な他の結合特性もまた用いられるだろう。すなわちペプチド上のN末端アミンまたは他の反応群、多分いくつかの結合剤の使用により、表面上の群と反応するだろう。

本発明の実施でどんな表面でも使用される。例として、本発明の実施に使用される特に適当な表面は、セラミック、金属、またはポリマー表面である。最も好ましいものとして、本発明は、ポリマー表面及びセラミック（ガ

ラス）表面の処理に用いられる。例として、ポリマー表面は、ポリ(ヒドロキシエチルメタクリレート) (PHEMA)、ポリ(エチレンテレフタレート) (PET)、ポリ(テトラフルオロエチレン) (TFE)、沸化エチレン (FEP)、ポリ(ジメチルシロキサン) (PDMS) 及び他のシリコンゴムからなる。色々なガラス表面は、提案した方法で処理することができるけれども、最も好ましいガラス表面は、グリセロルプロピルシランの結合したガラス(グリコフェーズガラス)からなる。特に好ましい重合物の表面は、ペプチド置換することなしに、細胞付着に抵抗する、水溶性ポリマーの物理的な内部に入り込んだネットワークをもったものである。

多くの細胞付着分子に含まれる最小のアミノ酸配列は、RGD (アルギニン-グリシン-アスパラギン酸アミノ酸配列)、またはYIGSR (チロシン-イソロイシン-グリシン-セリン-アルギニン) またはREDV (アルギニン-グルタミン酸-アスパラギン酸-バリン) である。細胞付着に活性のある最小アミノ酸配列を含むペプチドはどれでも本発明の実施に用いられるけれども、最も好ましい配列は、RGD、YIGSR、GRGD、GYIGSR、PDSGR、IKVAV、GRGDY、GYIGSRY、RGDY、YIGSRY、REDV、GREDV、RGDF 及びGRGDF である。

本発明の特に好ましい具体例で、ペプチドGRGDY

とGYIGSRYは、特別な型のセラミックであるグリセロルプロピルシランの結合したガラスの表面に化学的にゲラフトされる。これらの好ましいペプチドのC末端Yは、放射性標識ヨウ素化として含まれ、N末端G (グリシン) は、接着性ペプチドと表面の間の特別なペプチドによりスペーサーとして使用するために与えられる。小さなペプチドは、処理配列上に細胞を付着するのに必要な、細胞受容体認識部位を与えるのに用いられる。

本発明の特に好ましい他の実施例においてGRGD及びGYIGSRペプチドは、ポリマー表面の化学的な誘導に用いられる。本発明の最も好ましい実施例は、GRGDまたはGYIGSRYペプチドに誘導されたPHEMAまたはPETポリマー表面からなる。本発明の最も好ましい他の実施例は、GXIGSRYペプチドにより誘導されたPHEMAまたはPETポリマー表面からなる。

共有結合したペプチドを含むように処理された表面は、哺乳動物細胞受容体認識部位を与える、それによって細胞が基質に堅くくっつき、含まれている媒質の血清及び表面に吸着されたタンパク質とは独立に増殖するようになる。このようにして、開示された本発明法には、中間的などんな吸着タンパク質も存在しない状態で、受容体が媒介する細胞付着、すなわち、完全な自己機能による細胞付着と伸展を支持する表面を与える方法である。

細胞付着分子の最小のアミノ酸配列を含むペプチド断

片はどれでも本発明の実施に用いることができるが、少なくとも12アミノ酸残基 (mer) を含むペプチド断片が好ましい。およそ3から9の間のアミノ酸残基がさらに好ましい。最も好ましいペプチドは、4または6個のアミノ酸残基を含む。ペプチド断片の長さは、分解するペプチドの感受性に影響し、従って、断片が短くなればなる程ペプチド表面の分解はより少なくなることが予想される。

本発明はさらに、表面処理を施された生体医療移植用具と、同じものを製造する方法を含んでいる。このような処理表面を備えた用具は、細胞付着の量と割合、従ってin vivoでの用具の組織融和の割合を強化する。強化された細胞付着と組織融和は、感染を最小限にするよう作用する。能力ある組織通関港は、細胞の保護層によって“封印”閉じられながらである。

開示されたペプチドが化学的に移植されるどの用具表面でも、開示した方法で処理することができる。例として、これらの用具表面は、陰茎、膣、心臓、股関節部の移植または交換物；カテーテル；人工皮膚；血管及び動脈；人工腱及び韌帯；人工骨ねじ、骨板、骨片及び骨関節；神経成長ガイド；眼内レンズ及び類似物を含む。

ポリエチレンオキシド (PEO) 表面は、タンパク質の吸着を阻害することが示されてきたので、PEOが通常用いられる生体医療ポリマー、たとえばポリエチレンテレフタレート (PET)、ベレタン (ポリウレタン商

特表平5-502998 (14)

品、PELL) 及びポリメチルメタクリレート(PMMA)の表面に結合させた。PEO及びポリビニルピロリドン(PVP)やポリエチルオキサゾリン(PEOX)のような他の水溶性ポリマー(WSP)を組み込むために新しい溶液技術が用いられた。これらの表面のPEO、PVP及びPEOXは、接触角分析及びESCAを用いて証明された。修飾ポリマー上の短期間の血液適合性は、ポリマー表面における付着血小板の定量に用いられるエビケイ光ビデオ顕微鏡と連結して使用できるin vitroの平行板フロー方式で試験された。PEOで修飾した表面は、それぞれの対照表面より血栓形成が低下することが示され、分子量18500のPEOは5000よりも著しく低い細胞応答を示し、あるいはまた、10000分子量のPEOは他の水溶性ポリマーと同様であった。電子顕微鏡の走査は、血液が流れた後これらの表面で行われ、これらの試験はビデオ顕微鏡分析と同じ結果を示した。修飾した表面でのヒトの包皮纖維芽細胞の付着と伸展を用いて、細胞付着の防止効果をPEO、PVP及びPEOXについて試験した。PEO 18500修飾表面で劇的な反応が得られ、PEO 18500修飾表面では、これらの細胞の植えつけ後30日以上も極端に低い付着結果が得られた。他のすべての剤は5から10日以内に融合した。PEO 18500修飾表面だけが吸着されるタンパク質の顕著な低下を示したタンパク質吸着試験とあわせて、これら

の結果は、この分子量がタンパク質の吸着防止、従って修飾ポリマーの表面における細胞の相互作用の防止に適していると思われる。PEO 5000分子量は、この機能の有効な遂行のためには短かすぎ、またPEO 10000は、ベースポリマー表面に有効に組み込まれるには余りに長いかまたは大きすぎるようである。PVPとPEOXは、それらの反復単位にアミドをもち、これがタンパク質吸着と細胞付着へ導く潜在的な相互作用部位として作用しているかも知れない。従って、5000より大きく10000より小さいPEO分子量が、裸のポリマーへのタンパク質と細胞の付着を防止するために有効である。

これらの細胞非付着物質は、それら自身の効用をもっているけれども、それらはまた、付着促進ペプチドが付属した基本物質として用いられるに特に有用である。この立場で、タンパク質は表面に吸着せず、そして表面の付着促進物質だけがペプチドの形で化学的に添加される。これは、組み込まれる特別なペプチドを調節することで表面に構築される細胞型特性として、ペプチドを表面に付着させる結合アームの調整またペプチド表面密度の調整を可能にことができる。このような特性は、ペプチドが表面に吸着される時はタンパク質もまた吸着されて多数の接着信号が生ずるため不可能である。

開示されたペプチドにより処理された表面に与えられた細胞付着性と、このような処理表面を作りまた使用す

る方法を示しながら、証拠となる物質を、ここに記載する。処理表面は、たとえばブタ、ネズミ、昆虫及びヒトの細胞を含む細胞の種や型の培養に適している。申請者らは、本発明を証明するために色々な細胞を使用したが、それらの例としては、ヒトの包皮纖維芽細胞(HFF)、ブタの大動脈内皮(PAE)細胞、胚及び新生組織細胞を含むが、その例に限定はされない。しかしながら、本発明は、細胞のどの種または組織源とも結合して用いることができ、細胞のどのような特別な型によても、その使用は限定されない。次章は、本発明を実証するのに用いた特別な細胞型を培養するある好みの方法についてあらましを述べる。

細胞培養方法

3 T 3 細胞

スイスマウス胚から樹立された不滅胚細胞系、N1H/3T3は、American Type Culture Collectionの細胞貯蔵所(ATCC#CRL 1658)から入手した。培養は、10%ウシ胎児血清が補充されたDulbecco's modified Eagle's 培地に維持され、湿った5%CO₂雰囲気中で37°Cで培養された。細胞の集密な細胞単層は、磷酸緩衝液(PBS)中に0.5%トリプシン及び0.53mM EDTAを含む溶液中で37°Cで15分培養して取り入れられた。細胞は新鮮な培地に再懸濁され、細胞を新らしい培養皿に付着させ成長させることによって継代培養した。

ヒト包皮纖維芽細胞

ヒト包皮纖維芽細胞(HFFs)は、テキサス、オースチン、セント病院の新生児病棟の新生児の包皮組織から分離された初代細胞系である。およそ5-10新生児包皮が無菌的に無菌PBSに集められ、5mm²の片に細かくきざまれ、トリプシン-EDTA中で4時間培養された。HFFsは200gで5分間遠心分離によって集められ、10%のウシ胎児血清(GIBCO)、400μl/mlベニシリン(Irvine)及び400μg/mlストレptomycin(Irvine)が補充されたEagle's 培地(DMEM, Mediatoch)のDulbecco修飾培地に再懸濁され、湿った5%CO₂雰囲気中で37°Cで培養された。細胞は、集密細胞単層をトリプシン処理し、新鮮培地に細胞を懸濁し、新しいフラスコに細胞を植えつけて継代培養を行った。HFFsは廃棄される前に20継代まで培養基に維持された。

ブタ大動脈内皮細胞

ブタ内皮細胞は、犠牲にした小型のブタから得られた。内皮細胞はJaffe et(1973), J. Clin. Invest. 52: 2745-2756の方法で分離された。特に、犠牲にした小型のブタからのブタ大動脈組織部分は、血を除くため、あたたかい(37°C) PBSで洗滌し、10ccの注射器内におかれた。切片の管腔を、次にシゲマ型IIのコラーゲンの100μl/ml溶液で満した。組織は、次に37°Cで30分間培養された。大動脈の管腔

は、次に PBS で洗滌され、細胞は 200 g で 5 分間遠心分離され、20% ウシ胎児血清と抗生素質を補充した培地 199 に再懸濁された。懸濁液は培養フラスコに添加され、培養は、湿った 5% の CO₂ 霧囲気中で 37 °C で維持された。

ヒトの臍静脈内皮細胞

ヒトの臍静脈内皮細胞 (H U V E C s) は、テキサス、オースチン、セント病院の分娩室の分娩後の臍帯から、Jaffe 等の方法 (1973, J. Clin. Invest., 52 : 2745 - 2756) により分離される初代細胞系である。分娩後の臍帯は、5 - 12 インチの部分にクランプで締められ、胎盤の組織から切断され、無菌的に無菌 PBS に集められた。クランプは切断した臍帯から取り除かれ、臍静脈内の血塊は、ゆるやかな圧力を臍帯に加えて押し出される。血液は、無菌のビベットで静脈の一端から内部に貫通し、また静脈管腔に無菌の PBS をゆるやかに流して、静脈から洗滌される。静脈の開いた端は次に静脈を密封するため止血鉗子で外部から締められ、240 U / ml の[I型のコラーゲン (Sigma) を含む PBS がカニューレを通して静脈が完全に酵素溶液で満されるまで加えられた。カニューレが取り除かれ、静脈の開いた端は、クランプで締められ、臍帯はこの溶液と共に 30 分間 37 °C で培養された。30 分の培養期間後止血鉗子が除かれ、H U V E C s を含む溶液は無菌の遠心分離管に排出された。追加の 20 ml の無菌 PBS が静脈の

管腔を通して無菌の遠心分離管に集められた。200 g で 5 分間の遠心分離によって H U V E C s が集められ、20% のウシ胎児血清 (G I B C O) 、400 U / ml のペニシリソ、400 μg / ml のストレプトマイシン (G I B C O) 、100 μg / ml の内皮細胞成長補助剤 (Collaborative Research) 及び 100 μg / ml のブタのヘパリン (Sigma) を補充された培地 199 (M 199, G I B C O) に再懸濁され、湿った 5% の CO₂ 霧囲気で 37 °C で培養された。細胞は、集密細胞単層をトリプシン処理し、新鮮な培地に細胞を懸濁し、新しいフラスコに細胞を植えつけることによって維代培養された。H U V E C s は、廃棄される前に 5 継代まで培養基に維持された。

ヒト血管平滑筋細胞

ヒト血管平滑筋細胞 (H V S M C s) は、テキサス、オースチン、セント病院の分娩室の分娩後の臍帯から、Jaffe 等の方法 (1973, J. Clin. Invest., 52 : 2745 - 2756) によって分離される初代細胞培養である。H U V E C s が分離された分娩後の臍帯は、鉗子で外部から臍帯を繰返し押しつぶしたため外傷を起こしていた。[I型のコラーゲン (Sigma) 240 U / ml を含む PBS が静脈の管腔に添加され、静脈が完全に酵素溶液で満された。臍帯は締められ、この酵素溶液と共に 37 °C で 30 分間培養することが出来た。30 分の培養期間後、止血鉗子が取り除かれ、H V S M C s を含む酵

素溶液は無菌の遠心分離管に流し込まれた。無菌の PBS 20 ml を追加して静脈管腔を流し、無菌の遠心分離管に集められた。この管内の H V S M C s は 200 g で 5 分間遠心分離によって集められ、20% のウシ胎児血清 (G I B C O) 、400 U / ml のペニシリソ、400 μg / ml のストレプトマイシン (G I B C O) 、100 μg / ml の内皮細胞増殖補助剤 (Collaborative Research) 及び 100 μg / ml のブタのヘパリン (Sigma) を補充された培地 199 (M 199, G I B C O) に再懸濁され、湿った 5% CO₂ 霧囲気中 37 °C で培養された。細胞は、集密細胞単層のトリプシン処理、新鮮培地への細胞の懸濁及び新らしいフラスコでの細胞の植えつけによって維代培養された。H V S M C s は、それらが廃棄される前に 5 継代まで培養基に維持された。

ヒトの血小板 (P. T.)

ヒトの血小板は、多血小板血漿 (P R P) を得るために；ヘパリン化した全血 (4 U / ml) を 250 g で 15 分間遠心分離して得られた。血液は、健康な煙草を吸わない男性から集められた。P R P は遠心分離した血液から除かれ、血小板拡散分析に用いられた。あらかじめ刺された血小板 (Prestim. Plt) は、血小板拡散を測定する前に 5 μM ADP で処理された。

次の例は、好ましい実施例と本発明の有効性を述べるために紹介するが、ここにつけ加えられた請求の中で、特に別に指示がない限り、本発明が限定されることを意

味しない。

例 1 は、特に好ましいペプチド断片が合成される方法を述べる。

例 2 は、P H E M A ポリマー表面の誘導について述べる。

例 3 は、P E T ポリマー表面の誘導について述べる。

例 4 は、包皮細胞組織からの初代細胞培養を準備する好ましい方法を述べる。

例 5 は、誘導した P H E M A 及び P E T ポリマー表面への細胞付着について述べる。

例 6, 7 及び 8 は、ガラス表面の誘導、このような誘導ガラス表面の細胞付着と支持特性及び非誘導ガラス表面に対比して、色々なペプチドにより誘導ガラス表面に与えられた比較的細胞支持型の特性について述べる。

例 9 は、熱及びタンパク質の加水分解に対する誘導 P E T ポリマーとクリコフェーズガラス表面の相対的安定性を述べる。

例 10 は、非前処理 P E T ポリマー表面に対比して前処理した場合の細胞支持特性に関する比較試験を紹介する。

例 11 及び 12 は、生体医療移植 (例 11 - 内在カテーテル; 例 12 - 神経成長ガイド) について当該表面誘導工程を用いる提案方法を実証する。

例 13 は、色々な程度のペプチド置換により処理された表面における H F F 細胞付着と伸展について述べる。

特表平5-502998 (16)

例14は、グリコフェーズガラス-ペプチドを結合することができる細胞非付着基質の型について述べる。

例15は、繊維芽細胞と内皮細胞の付着を支持するが、血小板はしない、RGD物質と結合したグリコフェーズガラスについて述べる。

例16は、繊維芽細胞と内皮細胞の付着を支持するが、血小板はしない、YIGSR物質と結合したグリコフェーズガラスについて述べる。

例17は、繊維芽細胞と内皮細胞の付着を支持するが、血小板はしない、PDSGR物質と結合したグリコフェーズガラスについて述べる。

例18は、内皮細胞の付着は支持するが、繊維芽細胞または血小板は支持しない、REDV-物質と結合したグリコフェーズガラスについて述べる。

例19は、HUEVCまたは血小板伸展を支持しないが、神経突起の成長を支持すべきIKVAV物質と結合したグリコフェーズガラスについて述べる。

例20は、ペプチドを付着することができる重合性細胞非付着基質であるポリエチレングリコールが固定されたポリエチレンテレフタレートについて述べる(PET/PEGに省略)

例21は、繊維芽細胞と内皮細胞の付着を支持するが血小板または血管平滑筋細胞の付着を支持しないRGD-物質と結合したPET/PEGについて述べる。

例22は、内皮細胞の付着を支持するが、繊維芽細胞

または血小板または血管平滑筋細胞について支持しないREDV-物質と結合したPET/PEGについて述べる。

例23は、HUEVCまたは血小板の振展を支持しないが、HFF伸展を支持し、軸索成長を支持すると思われる、IKVAV-物質と結合したPET/PEGについて述べる。

例24は、ポリエチレンオキシドとその他の水溶性ポリマーを重合性生体物質の表面に組み込む溶液技術について述べる。

例1-小さなペプチド

本例は、12アミノ酸残基より少なく、少なくともアミノ酸配列アルギニン-グリシン-アスパラギン酸(RGD)を含むペプチドの特に好ましい合成方法を説明する。

これらの試験に用いられたペプチドは、GPDSGRY, GIKVAVY, GREDVY, GRGD, GRGE, GYIGSR, GRGDY, GRGEY, 及びGYIGSRYを含み、University of Texas Southwestern Medical Schoolのペプチド合成研究所でよく知られた方法で合成され、あるいはまたBiosynthesis, Inc., Denton Texasから入手した。

例2-PHEMAポリマー表面の製造

この実験は、小さなペプチド断片が共役的に結合したポリマー表面を作る特に好ましい1つの方法を述べるべ

く企画された。PHEMA(ポリ(ヒドロキシエチルメタクリレート))は、その無処理状態では細胞付着を支持しないことが判明したヒドロゲルである。

特に好ましいペプチドGRGD及びGYIGSRが、PHEMA表面水酸基群及び塩化トレシル活性剤を用いたペプチドのグリシン結合アームの末端第一アミンを用いて、ポリマー表面に移植された。各それぞれのペプチドの末端におけるGグループは、表面-活性ペプチド(GRGD)とポリマー表面の間の距離を長くするのに用いられた。

さらに特徴的には、結合方法は、反応成分にとっては有機溶媒、しかしポリマーにとっては非溶媒である塩化トレシルによるPHEMA表面ヒドロキシル成分の活性化を利用した。PHEMAフィルムは、その表面はヒドロキシエチル群により十分に供給されるので前処理は必要ではなかった。この修飾表面の細胞付着促進活性は、in vitroで細胞の付着と伸展分析が行なわれた例4に略記した方法で測定された。トレシルの残群は、ペプチドGRGDまたはGYIGSRの末端アミンによって水溶性溶媒中に移された。

非修飾PHEMAフィルムは、20μlの2,2,2-トリフルオロエタンスルホニルクロライド(塩化トレシル)及び2mlのトリエチルアミンを含む20mlの乾燥エーテル中で室温で15分間トレシル活性化された。活性化したフィルムは、次に0.2Mの重炭酸ソーダpH1.0

の緩衝液で洗滌され、ペプチドを結合するために、80ng/mlのGRGDを含む同じ緩衝溶液中に室温でおよそ20時間放置された。

例3-ポリ(エチレンテレフタレート)(PET)ポリマー表面の製造

本実験は、細胞付着を促進する小ペプチドの封入を容易にするように水酸基成分を欠いた表面を製造する特に好ましい方法の1つを述べるように企画された。

PET表面は水酸基成分の欠除したポリマーであり、従ってその表面は、ペプチドでその後修飾される前に、前処理されていなければならない。特に、PETフィルム表面は、求電子性芳香族置換によって修飾され、ヒドロキシメチルグループが表面に附加された。反応は室温で大気圧下で行われた。次にフィルムは18.5%(v/v)ホルムアルデヒドと1M酢酸におよそ4時間浸された。前処理されたPET表面は次に、例2に略記した

PHEMA表面について述べたように正確に修飾された。

次の記載は、水酸基成分を含まないPETマトリックスのようなポリマー表面を前処理する最も好ましい方法の紹介である。ヒドロキシル成分とそこへのペプチド断片の付着の表面修飾は、次の計画に従って行われた。

1.表面ヒドロキシメチル成分の付加

表面グループまたはポリマー表面の求電子芳香族置換の進行によるPETポリマー表面に対し、そこではPETポリマーは18.5%(v/v)ホルムアルデヒドと

1 M酢酸に室温で約4時間浸される。

2. トレシル活性化 - 表面ヒドロキシル成分に対し、そこでは、前処理されたPETフィルムは、2, 2, 2-トリフルオロエタンスルホニルクロライド（塩化トレシル）40μl及びトリエチルアミン2mlを含む20mlの乾燥エーテル中に室温で15分間浸される。

3. 洗滌 - 活性化PETフィルムは次に、ペプチドを結合するために、0.2M重炭酸ソーダ、pH1.0の緩衝溶液により室温で洗滌された。

4. 表面へのペプチド結合 - 洗滌したPETフィルムは次に、80ng/mlのGRGDまたはGYIGSRペプチドを含む同じ緩衝溶液に20時間置かれた。

例4 - ヒト包皮組織からの初代細胞培養

ヒト包皮繊維芽細胞(HFFs)は、テキサス、オースチン、セント病院の新生児病棟の新生児の包皮組織から分離された初代細胞系である。これらの組織から初代細胞系を樹立するために次の方法が用いられた：5-10新生児包皮が無菌的に無菌PBSに集められ、5mm²の片に細かくきざまれ、トリプシン-EDTA中で4時間培養された。HFFsは200gで5分間の遠心分離によって集められ、10%のウシ胎児血清を補充されたEngleの培地のDulbecco修飾培地に再懸濁された。細胞は集密細胞単層をトリプシン処理し、新鮮培地に細胞を懸濁し、新しいフラスコに細胞を植えつけて継代培養された。HFFsは廃棄される前に20継代まで培養された。

植えつけられた。処理したPHEMA基質は、例2に略記したように作られた。

培養方法

N1H/3T3 繊維芽細胞 (ATCC#CRL

1658, Rockville MD)は、ウシ胎児血清を補充されたDMEM中で、湿った5%炭酸ガス雰囲気中37°Cで培養された。ブタ大動脈は、犠牲にした小型のブタから得られた。内皮細胞は、Jaff等の方法(1973, J. Clin. Invest. 52: 2745-2756)で；コラーゲナーゼによって血管の内腔表面を豊かにする助けるよう修飾された方法で分離された。ブタ大動脈内皮細胞(PAE)は、10%ウシ胎児血清で補充されたDMEM中に上記と同じ培養条件で維持された。

表面修飾方法

GRGDはNilsson及びMosbach及び例3及び4に述べられたような塩化トレシル固定化法を用いてグリシル末端アミン経由でポリマー表面に移植される。2種類のポリマー表面が修飾された。すなわちポリ(ヒドロキシエチルメタクリレート)(省略してPHEMA)及びポリ(エチレンテレフタレート)(略してPET)である。結合方法は、ポリマーにとって非溶媒であるが、反応成分にとって有機溶媒の塩化トレシルによる表面水酸基成分の活性を利用した。

残ったトレシルグループは、ペプチドの末端アミンにより、水溶液溶媒に移された。

基に維持された。

例5 - 派生PHEMA及びPETポリマー表面の細胞付着試験

本実験は、中間に吸着されたタンパク質がない状態で、受容体-媒介の細胞付着が支持されるようなポリマー表面が設計され、合成されるかどうか-すなわち細胞付着と伸展を支持する完全に自己機能的な表面を製造することができるかを決定するために計画された。たとえば、コラーゲンまたはフィプロネクチンのような完全なタンパク質の固定化は行うことができるがしかし、タンパク質の加水分解、タンパク質分解及びタンパク質の変性などの困難さをともなっている。これをうまくやるために、大部分のCAMs、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸(RGD)の小さな；熱安定性のペプチド領域が、グリシン-アルギニン-グリシン-アスパラギン酸(GRGD)の形の中のグリシンN-末端連結部位によりポリマーフィルムの表面に共有結合された。これは本質的に生体付着された安定な表面、すなわち；その材料表面は、培地からの吸着されたCAMsとは完全に独立に細胞表面受容体と高い親和性をもつグループを含んでいる表面を生産した。この表面修飾は、培養系の最も効果的な活用を単純化するよく特徴づけられた基質を開発する体系的な方法を与える。マウスN1H-3T3(ATCC#CRL1658)繊維芽細胞は、洗滌され、処理及び無処理のPHEMA基質の両方の無血清培地に

ポリ(エチレンテレフタレート)(PET)は塩化トレシル活性のための水酸基群を利用できず、そのため表面ヒドロキシル化法が開発された。ヒドロキシメチル群をPETフィルムに付加する求電子性芳香族置換が用いられた(図1)。特に、商業的に利用できるPETフィルムは、特に例3で限定したように、18.5%(v/v)ホルムアルデヒド及び1M酢酸に室温で4時間浸された。PHEMAフィルムは、それらの表面に十分にヒドロキシエチル群が与えられるので、前処理の必要はなかった。

修飾PETと無修飾PHEMAフィルムは、40μlの2, 2, 2-トルフルオロエタンスルホニルクロライド(塩化トレシル)と2mlのトリエチルアミンを含む20mlの乾燥エーテル中に15分間室温でトレシルにより活性化された。活性化フィルムは次に0.2Mの重炭酸ソーダでpH1.0の緩衝溶液で洗滌され、およそ80ng/mlのGRGDを含む同じ緩衝溶液中に室温で20時間放置してペプチドを結合させた。ヒドロキシメチル成分によるPETフィルムの修飾及びトレシル活性化とGRGD結合を含む次の段階を図2に模式的に表している。

細胞伸展分析

N1H/3T3及びPAE細胞は、トリプシン処理により培養フラスコから分離し、無血清培地(1mg/mlのウシ血清アルブミンを含むDMEM)に懸濁した。細胞は、溶媒を含むBSA中で遠心分離によって2回洗滌し、

特表平5-502998 (18)

別に記載のない限り、無血清培地に 3 0 0 0 細胞／フィルム cm^2 の密度で植えつけ、通常の培養條件で培養した。伸展細胞は、たとえば明瞭な核、原形質突起及び多角形型のような形態的な型によって点数を数えた(図 3)。細胞は、Leitz Fluovert の倒立顕微鏡で Hoffman 調整対照光学法を用いて 2 0 0 \times の倍率で可視化した。細胞の増殖はまた、10%ウシ胎児血清を付加した培地で培養した細胞について、色々な時間点で伸展細胞を測定することによって評価された。

アクチン緊張維織可視化

修飾表面に付着した細胞内のアクチン緊張細胞とミクロフィラメント束の可視化のために、NBD フララシン(7-ニトロベンズ-2-オキサ-1, 3-ジアブリルフララシン)(分子プローブ、Inc. Eugene, OR)が用いられた。試料は製造会社の方法で作られ、Leitz E 3 励起フィルター及び紫外線ミネーションの装備された Fluovert 顕微鏡を利用して観察された。

可溶性ペプチド競争試験

競争試験で、3 T 3 繊維芽細胞は、およそ 90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の RGDS を含むまたはペプチドなしの無血清培地のどちらかで 30 分間前培養された。細胞は次に、RGD誘導の PET 上におよそ 3 0 0 0 細胞/ cm^2 の密度で植えつけられ、通常の培養條件で 3 時間培養後に伸展が測定された。

RGD誘導基質は、それらの表面に細胞の活性付着

を支持する能力で特徴づけられた。PET 前処理は、色々な時間帯でヒドロキシル化された塩化トレシル活性化フィルムへの GRGD 結合により効果的に活用された。N 1 H / 3 T 3 繊維芽細胞を用いる細胞伸展分析は、最大の反応が維持された條件で測定するように行われた。4 時間の前処理は、最大の細胞付着と伸展に適当であるように思われた。PHEMA フィルムは、低濃度のペプチド($80 \text{ ng}/\text{ml}$)を利用して GRGD が誘導され、1 0 0 0 倍量の細胞付着の増加結果を生じた(図 4)。

GRGD 結合 PET フィルムと、通常の結合條件で GRGD と共に培養した前処理のみのトレシー処理で活性化されなかったフィルムとの比較では、後者のフィルムにはわずかのペプチドしか付着せず、あるいはまた吸着されたペプチドは、受容体-媒介付着反応に利用することが出来なかった(図 5)。GRGD 修飾表面は、血清の存在下でさえ無処理の PET よりも、はるかに良好な 3 T 3 細胞付着を支持し、これは修飾表面の固有活性の表示である(図 6)。

競争実験では、 $90 \mu\text{g}/\text{ml}$ の RGDS の存在で、修飾表面への付着が 75% 減少する結果を生じ、それはさらに基質の生体特有の活性を立証する(図 7)。修飾フィルム上の、無血清培地の伸展 3 T 3 繊維芽細胞の全部の形態(図 3)は正常であるように見えた(図 3)。

如何なる細胞骨核組織も RGDS 修飾表面に観察されなかつたということは、RGDS 修飾表面上ではこの細

胞系は完全な付着反応及び、それ以外のものは得られないことを示す。しかしながら、これは一般的な現象ではなく、正常なラットの腎臓の纖維芽細胞及び NIH 3T3、正常なハムスターの纖維芽細胞系を含むいくつかの細胞型は、単に RGDS ペプチド(14)のみを含む基質にも十分な反応を示してきた。RGD誘導-PET 上での増殖は、血清依存性であり、非修飾 PET(図 8)のそれと似ていたが、しかし、この図で RGDS 曲線(白四角)が対照曲線(黒菱形)をリードしていることから分るように、最初の付着と伸展ははるかに早かった。

RGD 結合表面上でのブタ大動脈内皮細胞の付着と伸展もまた、血管内皮 RGDS 指向型受容体が特徴づけられていたことから(15)、予想されたように血清には依存性がなかった。完全培地における PAE 細胞伸展は、4 時間で、RGD 誘導フィルム上の方が、無処理のフィルム上よりはるかに広範囲であったがしかし、24 時間では、両表面共に集密単層細胞を示した。これらの観察から、PAE 細胞付着の運動性は、修飾表面でより急速であることが示された。

申請者の開示した方法は、不溶解性細胞外マトリックス信号への細胞反応を試験するのに使用される安定した化学的に限定された表面を得る方法を与える。それはタンパク質吸着からの細胞付着と伸展を脱着させる方法を与える。この考え方で、細胞付着分子(CAMs)を含む必要のない無血清培地(すなわち、血清から供給され

るよりもむしろ純粋なタンパク質が個別に添加される培地)を使用することを好む人々にとって有用であろう。これらの表面が、非常に低い血清濃度で細胞増殖を支持する能力があるかどうかはその測定が今後に残されている。

培地タンパク質の存在で、RGD 表面は吸着したタンパク質により急速におおわれるることを理解すべきである。しかしながら、これは、申請者らの培養基中のアルブミンによる試験で(図 4, 5, 7)示されたように、高い親和力をもった RGDS の統合的な結合能力が吸着したタンパク質と有利に競合することによって問題にはならない。細胞分離は、RGD - 統合親和力がカルシウム依存性があるので、カルシウムキレート化によって目的が達せられるだろう。

細胞機能は、細胞付着表面に高度に依存することもまた、注意すべきである(16, 17)。この表面は、in vivo でそれに近づいた局部的な環境を与え、そのためにより強力な付着及びまたはより高い生産性を刺戟する。

例 6 - ガラス表面のペプチド誘導

本例は、細胞受容体-媒介付着促進基質を与えるために、ガラスのようなセラミック表面を誘導する最も好ましい方法の概略を述べるために計画された。

グリコフェーズガラスは、Ohison 等の方法(18)によって作られた。ガラスカバースリップ($18 \times 18 \text{ mm}$; Thomas)は、0.5 M 水酸化ナトリウム中に 2 時間浸し、

特表平5-502998 (19)

イオン交換水で洗滌し、(3-ケリシドキシプロビル)アトリメトキシラン (Petrarch Systems, Inc.) の水溶液 (1% pH5.5) 中に浸した。標本は加熱され、90°Cで2時間維持された。次にpHを3.0に調整し、誘導ガラス上のオキシラン成分をグリコール群に変換するために再び1時間加熱した。乾燥グリコフェーズガラスカバースリップは、乾燥アセトン (乾燥したモレキュラーシップ4A; Fisher) で洗滌された。約1mlの乾燥アセトンに、約200μlの乾燥ビリジンと約100μlの乾燥塩化トレシル (Fluka) が加えられた。この混合物の最小量を、ガラス結晶皿におかれた各グリコフェーズガラスカバースリップの上部表面に添加した。反応は室温でおよそ10分間で進行し、次いでカバースリップを、約1mMの塩酸で洗滌し、最後に約0.2Mの重炭酸ソーダのpH9の緩衝溶液 (結合緩衝溶液) で洗滌した。約5-30ng/mlのペプチド、好ましくは約10ng/ml、を含む結合緩衝液の最小量をカバースリップに添加し、ペプチドを表面に移植するため室温で約20時間培養した。この試験に用いたペプチドは、例1に概略述べたように合成された。緩衝液を含むペプチドは、20時間の培養期間後取り除かれ、約0.8Mのベーターメルカブトエタノールを含む結合緩衝溶液に置きかえられた。カバースリップは、未反応のトレシル群が非接着成分と反応するように約2時間培養された。

ペプチド表面濃度の測定

で培養した。ガラス表面の単位面積当たり、溶解ペプチドのモル濃度が反応しうるよう、投入濃度を制限した。表面濃度は、ガラスの単位面積当たり結合するペプチドのモルとして限定され、洗滌したガラス試料をガンマー計測器で計測し、標識ペプチドの比放射能を基にその値を計算して測定された。

細胞付着受容体の2組の重要な級としての配位子を含む合成ペプチド Gly - Arg - Gly - Asp - Tyr (GRG DY) 及び Gly - Tyr - Ile - Gly - Ser - Arg - Tyr (GYIGSRY) は、N-末端ケリシンによって、非-付着修飾ガラス表面、グリセロルプロビルシラン結合ガラス (グリコフェーズガラス) に共有結合された。グリコフェーズガラスは、水を吸収しかつヒドロゲルと同様に、水溶液の膨潤とバルクの滲透の関連した問題なしにタンパク質の吸着を減少させる共有共合の有機層を含んでいる。グリコフェーズガラスは、タンパク質をわずかしか吸着しないので、培地に血清があつてさえ、細胞付着の支持には適当ではない。そのため、GRG DY と GYIGSRY が、Nilsson 等の塩素化トレシル固定化法、((1987), *Methods Enzymol.*, 135: 65-78) を用いてグリコフェーズガラスに結合された。Nilsson 等の文献は特に文献によりここに取り入れられている。

N-末端 "G" は、付着ペプチドと表面の間のスペーサーとして用いられ、また C-末端 "Y" は放射性標識

GRG DY は、およそ 5.0 mci の Na^{125}I を含む pH 7.4 の撹拌緩衝液へ約 20 μg のペプチドを添加し、ヨードビーズ (Pierce) と共に室温で約 15 分間培養する、製造会社の指示に従った方法で放射性標識が行われた。標識化ペプチドは、Sep-Pak C₁₈ 試料製造カートリッジ (Waters) に反応混合物を加え、メタノール-水-トリフルオロ酢酸 (TFA) (80:19:1 v/v) で洗滌し、PBS で平衡状態にして精製した。カートリッジは、組み込まれなかったヨードを溶出するため 1% v/v TFA で洗滌した。反応混合物は、1% TFA 中のメタノール濃度の 10% 逐次増加法を用い、最終溶出液はメタノール-水-TFA (80:19:1 v/v) で分別された。カートリッジは、放射能活性がベースラインに戻るまで、各濃度で洗滌された。各フラクションは、220 nm (エピシロン = 8441 M⁻¹ cm⁻¹) の吸収が測定され、ペプチド濃度が分析された。溶出ペプチドの 90% 以上は、メタノール-水-TFA (40:59:1 v/v) のフラクションにあり、凍結乾燥して PBS 中で再構成された。ペプチドの比放射能は、標識ペプチドの既知量を自動ガンマー計数器 (Isوفレックス, INC. Micromedic Systems) で計数後、測定された。平均比放射能は、44.0 ± 2.0 mci / mmol であった。

ペプチド表面濃度を測定するため、標識ペプチドを色々な濃度で結合緩衝液 (0.2M 重炭酸ソーダ, pH 10) に添加し、トレシル活性化ガラス上で 20 時間室温

ヨウ素化用いられた。第一アミンは求核的に作用し、塩化トレシル-活性化支持物質と反応し、共有的に結合するので、用いられたペプチドは、N-末端 "G" の第一アミンを通して独占的にグリコフェーズガラスに結合した。ペプチドの表面濃度は、¹²⁵I 標識物によって測定され、12.1 picomoles / m² であった。この誘導法は、化学的に安定な基質を生産し、表面で利用できるペプチドの量は正確に測定されまた調節されるので、受容体-仲介細胞付着の研究には有用であろう。

例7-ペプチド誘導ガラス表面での細胞の付着と伸展

本例は、ガラス表面への細胞付着の量と速度を促進する上で、提案した化学的ガラス表面処理法の有効性を測定するために計画された。

基質の製造

グリコフェーズガラス基質は、例6に記載した方法で作られた。これらの修飾された基質は、吸着されたタンパク質とは独立に、培養されたヒト包皮纖維芽細胞 (HFFs) の付着と伸展を支持した。

測定されたバラメーター

移植された GRG DY 及び GYIGSRY の両方の生物学的活性は、培地の血清の存在及び欠陥における HFF の付着と伸展の測定によって評価された。巣状の細胞接触形成及び細胞骨核組織がまた、これらの基質上に観察された。

結果

HFF の伸展速度は、移植した YIGSR (GYIGSRY) ベブチド基質上では、RGD 含有 (GRGDY) ベブチド表面よりも非常におそかった。細胞はオカルコンタクトを形成し、または血清の存在下での RG D 誘導基質上では形成しなかった。巢状接触は、血清が培地に存在した時にのみ、YIGSR - グラフト表面に形成され、RGD - 含有表面上に観察されたものとは形態的に区別された (図 10 ; 図 12)。

付着タンパク質の吸着は、すべての表面で最低であったが、血清は、ミクロフィラメントの組織化と付着細胞の伸展の範囲に影響を及ぼした。

例 8 - 誘導ガラス表面におけるベブチド断片 GRGDY, GYIGSRY 及び GRGEY の比較試験

誘導ガラス表面は、GRGDY, GRGEY 及び GYIGSRY ベブチドを用い、例 6 に記載の方法により作られた。HFF 細胞が次にそれぞれの作られた表面に置かれた。伸展と増殖速度の測定が行われた。無処理のグリコフェーズガラスは、血清を付加した培地内の基質上で細胞が培養されても、細胞付着の支持はみられなかつたが、これは、タンパク質 - 結合力の低い基質であることを示している。

ベーターメルカプトエタノール - グラフトガラスは、細胞伸展試験の結果に示したように (図 2B, D : 3B, D) 、同じように細胞付着と伸展の支持はみられなかつた。ベーターメルカプトエタノールは、ガラス表面上に

残っているトレシル群と反応するのに用いられたので、非付着のバックグラウンドは、この表面で設定された。さらに、本質的に受容体 - 媒介細胞付着を支持せず、グローブ化 GRGDY と同様にタンパク質を吸着するグローブ化 GRGEY は細胞付着を支持しなかつた (表 1)。この結果は、グリコフェーズガラス上の固定化 GRGDY は、この基質上に著しくタンパク質吸着を強めることはないことを示唆している。

伸展及び増殖速度測定

HFF 細胞は、例 4 に概略記載のように作られた。これらの細胞は、実験のために刈り取られ、Ca²⁺ 及び Mg²⁺ のない磷酸緩衝液 (PBS) で 2 回洗浄され、次に 0.05% トリプシンに 0.53 mM EDTA を含む PBS (GIBCO) を加えた溶液中で 10 分間培養された。細胞は遠心分離によって集められ、血清補足培地または、2 mg/ml の熱不活性化 (90 °C, 10 分) アルブミン (Sigma) 及び抗生物質の加えられた DMEM からなる培地中に再懸濁された。

完全培地または無血清培地に懸濁された細胞は、基質上におよそ 10,000 細胞/cm² の密度で植えつけられ、5% CO₂ 霧囲気で 37 °C で付着し伸展させた。位相差対物レンズと高解像ビデオカメラ (67M シリーズ, Dage-MTI) を備えた倒立顕微鏡 (Fluovert, Leitz) を用いて、色々な時間点で伸展細胞を観察した。

画像は、画像解析方式 (シリーズ 150, Imaging

Technology Inc.) でデジタル化され、個別の細胞の面積は、デジタル化画像内の各細胞の周辺の長さをトレーシングパッド (Digi-Pad, GTCC) でトレースし、各トレースによって囲まれた面積を積算ルーチンで計算することによって測定された。少なくとも 100 細胞が分析され、細胞伸展速度が測定されるように、積算ヒストグラムが各時間帯毎に作図化された。

基質上の完全培地内の細胞増殖は、100 倍位相差顕微鏡で細胞を可視化して調べられた。色々な時間帯で、細胞は 10 視野で計数され、増殖表面の単位面積当たりの細胞数は、視野の面積当たりの平均細胞数を基に計算された。

細胞伸展分析の終点で、タンパク質の合成は、それらを基質に植えつける前に、20 μg/ml のシクロヘキシミドで 30 分間細胞を処理することによって阻害した。細胞は実験中を通してシクロヘキシミドを含む培地に維持された。可溶性ベブチドで処理された細胞は、ベブチドを含む培地で 30 分間前培養され、実験期間を通してその培地に維持された。伸展細胞は、Massia 等により述べられた方法 (1989) (Biochem. Engin. VI, Ann. N. Y. Acad. Sci., Vol. 589, pp. 261 - 270, 1990) に従って 10 視野で数えられた。視野当たりの伸展細胞のパーセンテージは、視野当たり全細胞数に対する伸展細胞の割合を 100 倍することによって計算された。

形態試験

ベブチド - グラフト化 24 × 50 カバースリップ (Thomas) への細胞付着は、培養室ステージにのせられ、Fluorovert 倒立顕微鏡に固定された。NPL Fluotar 100 × (Leitz) 対物レンズを用い、透過位相差及び干涉反射 (IRM) 顕微鏡が同じ視野で、対物レンズを変えることなく操作できるようにした。位相差と IRM 画像は、培地に沈めて 37 °C に維持されている生きた細胞から得られた。位相差の照明は、100W のハロゲンランプ及び熱反射フィルターを装着した型 050260 出力装置 (Leitz) によって与えられた。HBO 100 型 990023DC ソース (Leitz) により出力される 100W 水銀アークランプが IRM 用として用いられた。画像は、高解像ビデオカメラ (70 シリーズ, Dage-MTI) によって得られ、シリーズ 150 画像解析法でデジタル化された。デジタル化画像は高解像ビデオモニター (型 PVM 1271Q, Sony) から Ilford Pan F フィルムを用いて写真撮影された。

けい光顕微鏡

培養時間が終ったベブチド - グラフトガラスカバースリップ上の細胞は、PBS 中で洗浄され：PBS 中 3.7% (v/v) ホルムアルデヒドで 20 分間固定化された。それらは次に、PBS 中で洗浄され、およそ 0.2% (v/v) トリトン X-100 を含む PBS 中で室温で約 1 分間の培養で透過性にされた。細胞は次に PBS 中

特表平5-502998 (21)

で洗滌され、およそ 900 ng/ml のロダミン-共役ファロイジン (Molecular Probes, Inc.) により室温で 20 分培養して F-アクチンで染色された。カバースリップは、PBS で全部を洗滌され、50% PBS - 50% グリセロル内で顕微鏡スライドにのせられた。これらの標本は、100×PL Fluotar 対物レンズ (Leitz) を備えた Fluovert 顕微鏡で観察され、写真撮影された。

結果

G R G D Y 表面濃度の測定

表面における反応部位の数と相当するペプチド濃度は、標識 G R G D Y (図 9) による滴定で測定された。グラフト化 G R G D Y の表面濃度は、表面への結合のために利用されるペプチドの濃度の増加と共に直線的に増加し、最大値 12.1 ± 0.1 picomoles/cm² (図 9) に達することが測定された。12.0 picomoles/cm² 以上の濃度のペプチドをその後投入しても、それ以上ペプチドの表面濃度は増加しなかった。12.1 picomoles/cm² の最大表面濃度は、73.000 分子数/μm² の表面範囲または、ペプチド間が概算 3.3 nm の間隔に相当する。

ペプチド-グラフト化基質上の H F F 伸展速度

RGD 誘導ガラス上の細胞は、血清のあるなしにかかわらず、2 時間の間連続的に伸展することが観察され、完全培地では (図 10 A)、植えつけ後 2 時間で、分析された細胞の 50% が 2130 μm² またはそれ以下の面積をもち、また無血清培地 (図 10 C) の場合は、植え

つけ後 2 時間で、50% の細胞が 1210 μm² またはそれ以下の面積であった。完全培地で組織培養プラスチック上の良好伸展した細胞の平均面積は、2100 μm² であることが観察され、そこでは、非伸展細胞は平均 355 μm² の面積を持っていた。非付着表面で培養された細胞の面積範囲は、血清のあるなしで変ることなく 50% の細胞が 500 μm² 以下の面積であった (FIG S, 10 B, D)。これらの結果は、これらの表面では何の伸展も起らず、細胞の大部分は非付着性であることが観察された。

細胞伸展はまた、血清の存在、非存在下での Y I G S R - 誘導ガラス上で観察された。伸展速度は、グラフト Y I G S R 表面では、RGD-含有表面より非常におそく、完全培地 (図 10 A) または無血清培地 (図 10 B) で、伸展の完了まで 6 時間以上を必要とした。無血清培地でおよそ 9 時間後、分析された細胞の 50% は 1400 μm² またはそれ以下の面積をもち (図 10 B)、これは無血清培地での RG D 表面の良好伸展した H F F s の面積に匹敵する。血清は、Y I G S R 表面の細胞伸展を強化することが認められた；すなわち、植えつけ後 9 時間で、分析された細胞の 50% が 2333 μm² またはそれ以下の面積をもっていた。非付着対照表面は、RGD 誘導ガラス試験用として作られたものと同じで、細胞の伸展は、これらの表面ではみられず、試験の時間枠全般を通じて細胞面積の 50% は、600 μm²

を超えることはなかった。

細胞増殖における移植 G R G D Y の効果

細胞増殖におけるこれらの RG D - 含有基質の効果は、結合 G R G D Y を含むガラスに植えつけられた H F F s の増殖をモニタリングしてしらべた。RGD 誘導ガラス上で培養した細胞の増殖を無処理 (グリコフェーズではない) ガラスのそれと比較した際、増殖速度についての相違は何も見られなかった (図 11)。

ペプチド-移植基質に対する細胞反応の特徴

血清は、ペプチド含有ガラス上の細胞の伸展を強化したので、非付着ガラスの表面へ移植されたペプチドは、血清の吸着を促進し、これらの基質上の細胞の付着と伸展を増加するであろう細胞タンパク質を分泌すると仮定された。この可能性のある効果をチェックするため、合成ペプチド G R G E Y をガラスに結合させ、これらの表面での細胞伸展が分析された。アスパラギン酸 (D) に対するグルタミン酸 (E) の置換 (1 つのメチレングループのカルボキシル酸側鎖への付加) は、ペプチド (B) の付着促進活性を廃止することが立証されたがしかし、ペプチドが潜在的に吸着タンパク質と相互作用する道に対する影響はあまりない筈である。

共有的に結合した G R G E Y 上には、たとえ完全培地が使用されても、また細胞のタンパク質合成が阻害されなかった時でさえ (表 1) 8 時間後に細胞の伸展は観察されなかった。これらの発見は、共有的に結合した

G R G E Y 及び G R G D Y ペプチドは、細胞伸展を促進した強化するような細胞付着タンパク質の吸着を顕著に増加しないことを示唆する。

これは、表面に移植されたペプチドの細胞付着作用は、細胞表面受容体に対するペプチドの親和力によるものであって、ペプチドによる血清タンパク質吸着の強化によるものではないということである。

RG D 及び Y I G S R の結合基質上の細胞付着にタンパク質合成が役割りを演じたかどうか、また、伸展が完了した時点で、伸展した細胞のフラクションを血清が著しく増加したか否かを測定するため、8 時間の培養後、異なる条件下で、伸展細胞の百分率が測定された。タンパク質合成も、培地中の血清の存在も、RG D- 及び Y I G S R 誘導ガラス上の伸展した細胞のフラクションに影響しないことが観察された。両方のペプチド-グラフト表面上の細胞伸展は、完全に阻害されたがしかし、培地中の可溶性ペプチドの存在により (表 1) これらの基質上の細胞の付着は、初期に細胞受容体-配位子相互作用により左右されることを示している。

特表平5-502998 (22)

表 1

表面に グラフ した ペプチ ド	培地中の 血清 (10%v/v)	培地中の シクロヘ キシミド (20 μg/ml)	培地中の ペプチド (200 μg/ml)	付着細胞 (%)
GRGEY	+	+	-	0
	+	-	-	0
	-	+	-	0
	-	-	-	0
GRGDY	+	-	-	87 ± 8
	+	+	-	80 ± 9
	-	-	-	91 ± 4
	-	+	-	83 ± 10
	-	-	+ (RGDS)	0
	-	+	+ (RGDS)	0
	+	-	-	78 ± 7
DYIGSR	+	+	-	82 ± 2
	-	-	-	81 ± 12
	-	+	-	90 ± 2
	-	-	+ (YIGSR)	0
	-	+	+ (YIGSR)	0
	+	-	-	78 ± 7
	+	+	-	82 ± 2

細胞 - 基質接觸及び細胞骨核組織

RGD - 誘導基質に植えつけ後およそ 4 時間目に、また、YIGSR - 誘導基質に植えつけ後およそ 8 時間目

地に培養された伸展細胞によって形成された束は、無血清培地で培養された細胞により形成されたものより、より極端に染色され、血清が存在した時は厚い纖維状であった。YIGSR - 移植基質上に無血清培地で培養された細胞は、ほんのわずかのミクロフィラメント束しか形成しなかったがしかし、血清が培地にあつた時は、厚い束を形成した。これらの試験は、最小配列の付着 - 促進合成ペプチドは、たとえばグリコフェーズガラスのような非透過性、非接着性の材料の表面に共有結合的に移植されて、細胞接着を支持する生物学的に活性な、化学的によく限定された表面を生産することができる事を示している。これらの基質は、表面に利用できるペプチドの量が正確に測定され（図 9）、また結合緩衝液にグリシンのような非付着剤の適当量を加えて、競合的に、移植されるペプチドの量を、調節することが可能であるため、細胞付着の試験には有用であろう。これは、受容体 - 媒介細胞付着の基準基質として重要な必要条件であろう。何故ならば、最近、吸着されたRGD - アルブミン複合体へのインテグリン - 伸展細胞付着が、生のタンパク質に共有結合的に付着するRGD - 含有グループの密度に極めて敏感であることが示されたからである。

例 9 - ペプチド - 移植基質の安定性

固定化ペプチドが熱及びタンパク質加水分解にどの程度安定であるかを測定するために標識RGD Yペプチドがグリコフェーズガラス基質に共有結合的に移植され

に、細胞は IRM 及び位相差顕微鏡により生きたまま調べられた。固定した標本は、伸展細胞中のミクロフィラメントの分布を調べるためロダミン - 共役ファロイジンで染色された。すべての画像は、デジタル化され、精度を高めるためハイパスフィルターが用いられた。

無血清で RGD - 移植ガラス上に植えつけられた細胞は、主として細胞の外縁に小さな円いフォカルコンタクトを形成した（図 13 B）。血清を補充した培地は、細胞付着分子 - 被覆基質上にひろがった大きな延長したフォカルコンタクト型の細胞形成を支持した（図 13 D）。YIGSR - 移植ガラス上の伸展細胞は、無血清の場合巢状接觸を形成しなかった（図 14 B）。培地が血清で補充された時、フォカルコンタクトがこの基質上に限定してみられたが（図 14 D）、それらは、形態的に、RGD - 誘導基質上の図 13 D のものとは異なっていた。YIGSR - 誘導基質上の巢状接觸は、図 13 D にあるものと同じように延長型であったが、細胞の外縁に顕著に局在していた。位相差画像は（図 13 A, C; 14 A, C）色々な基質上の伸展細胞の間に何等明瞭な形態学的差異を示さなかったが、IRM 画像に相当する画像として役に立っている。

ロダミン - ファロイジン染色は、無血清培地（図 15 A）または完全培地（図 15 B）で培養された RGD - 移植ガラス上の、伸展細胞での作用性ミクロフィラメント束の広範なネットワークを明らかにした。血清補充培

た。放射活性のパーセント (%) ロスは、分解して細胞付着強化に利用できなくなった固定化ペプチドのパーセント (%) を示すと解釈された。データは、これらのペプチド - 移植基質は、オートクレーブ処理（121°C で蒸気滅菌）に備めて安定であることを示唆し、この処理により放射活性のロスは何等実証されなかつた（表 2）。また、これらの基質上で 1 週間細胞培養を行つたが、放射活性のロスは認められなかつた。データはまた、処理した基質は、細胞プロテアーゼに対しても安定であることを示している。

表 2

RGD - 誘導グリコフェーズガラスの安定性

基質放射活性への 環境的ストレス	ロスの %
オートクレーブ（121°C、15分）	0 ± 0
細胞培養（1 週間）	2 ± 1
トリプシンへの曝露	5 ± 4

例 10 - G R G D 結合 P E T 基質の、前処理したトルソル化しない P E T 基質に対するペプチド吸着比較

GRGD 誘導 PET 基質は、それらの表面への細胞の活性付着を支持する能力によって特徴づけられた。PET 前処理は、色々な時間帯でヒドロキシル化された塩化

特表平5-502998 (23)

トレシル活性化フィルムにGRGDを結合することによって最も効果的に活用された。NIH/3T3 細胞を用いた細胞伸展分析が、最大の反応条件を支持する条件を決定するために実施された。およそ4時間の前処理が、最大の細胞付着と伸展のために最適であるように思われた(図17)。

“正常”結合時間(約20時間)としてGRGDにより培養されたGRGD結合PETフィルムと前処理した非トレシル化フィルムの比較から、フィルムへのペプチド吸着が少ないかあるいは、吸着したペプチドが受容体介付着反応に利用されないかの何れかが実証された(図5)。GRGD修飾表面は、血清の存在下でさえ、無処理のPETよりも3T3細胞付着を非常に良く支持し、修飾表面上の本質的な活性を示している(図6)。競争実験は、基質の生体特有の活性を一層立証するGRDSの約90μg/mlの存在で、修飾表面への付着は75%減少という結果を生じた(図7)。

無血清培地で、修飾フィルム上の伸展3T3細胞の全形態(図3)は、正常であるように見えたかしかし、これらの条件下で、ミクロフィラメント束と緊張繊維の形成は検出されなかった。これらの結果は、吸着RGDペプチドについて他に示されたように(19, 20, 14)、この細胞系及び他での完全な付着反応は、これらの修飾表面上では得られないことを示している。しかしながらこれは一般的な現象ではなく、正常なラッ

トの腎臓の纖維芽細胞及びNIH 3T3正常なハムスターの纖維芽細胞系、を含むいくつかの細胞型は、単にGRGDペプチド(14)のみを含む基質にも十分な反応を示してきた。GRGD誘導-PET上での増殖は、血清依存性であり、非修飾PET(図8)のそれと似ていたがしかし、GRGD曲線が対照曲線をリードしている観察によって示されるように(図8)、初期の付着と伸展はもっと急速であった。

GRGD結合表面上でのブタ大動脈内皮細胞の付着と伸展もまた、血管内皮RGD指向型受容体が特徴づけられていたことから(15)予想されたように血清依存性ではなかった(図16)。完全培地におけるPAE細胞伸展は、4時間でGRGD誘導フィルム上では、無処理のフィルムよりはるかに広範囲であったがしかし、24時間では、両表面共に集密単層細胞を示した。これらの観察から、PAE細胞付着の運動性は、修飾表面で、より急速であることが示された。

例11—ウサギにおける生体付着ダクロンベロアカフをもつ内在カテーテル

(予測的に)

内径約1mm及び外径3mmのダクロンベロアカフは、基部で、ポリエチレンカテーテルの周囲におかれ、外科手術用セメントで接着されている。カフの設置前に、表面をヒドロキシル化するために例3で述べたように酢酸/ホルムアルデヒド溶液中で処理されるべきである。次に

テトラペプチドGRGDが例3に述べたように、トレシル活性と結合によってカフ材料表面に共有結合的に付着されるだろう。動物の毛皮は腹部沿いに刺りとり、長さ約1cmで側方に皮膚を切り開く。カテーテルは、静脈、たとえば下行大静脈に挿入され、カフは丁度皮膚の下側に置かれるだろう。皮膚は、突き出たカテーテルの周りに、カフをおおうように一緒に縫い合わされるだろう。カテーテルでの細菌の感染率がそこで測定されるだろう。いくつかのカフが一定時間後だとえば1, 2, 3及び4週間後に、組織同化、再成長及び炎症の組織学的調査のために取り除かれるだろう。対照実験は、非修飾ダクロンカフが利用できるだろう。

例12—神経再成長ガイド

(予測的に)

内径約1.5mm及び外径約3mmで水及び酸素に高い透過性を示すポリマー管がラットの再成長ガイドとして使用されるだろう。有用な材料の例は、ポリ(ヒドロキシエチルメタクリレート)であろう。管腔は、例3で述べたようにペプチドGRGDまたはGYIGSRで結合されるだろう。1つの足の神経束は重病で、一部分がほぼ1cmの長さで取り除かれるだろう。神経束の両末端が管の再成長の端に挿入されるだろう。そしてガイドの縁がエビアクソナル組織にしっかりと縫い合わされるだろう。傷口が閉じられ、神経再植法は毎週、電気生理学的に測定されるだろう。対照実験は、非修飾ポリ(ヒドロキシ

エチルメタクリレート)管を利用すべきである。

例13—誘導ガラス表面上の異なった密度でのGRGDY移植の比較試験

誘導ガラス表面は、トレシル活性化ガラスに添加されるペプチド量が1.2 picomoles/cm²より少ない場合を除いて、GRGDYを用い、例6に記載の方法に従って作られた。これにより、既知のペプチド表面密度をもつ基質が形成された。例6に関連して図9の直線領域は、反応性ガラスに添加されたペプチド量は、1.2 picomoles/cm²より少ないか、または等しい限り、ガラスに結合したペプチド量に等しいことを示している。ペプチドは、表面濃度が0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5及び1.0 picomoles/cm²で誘導ガラスに共有結合的に付着された。ヒト包皮纖維芽細胞が、4時間の培養後に単にタンパク質と細胞伸展だけが測定されるように、熱不活性化アルブミンを含むDMEM中の材料に植えつけられた。細胞は次の案に従って、伸展の形態に等級をつけた：円細胞、糸状偽足なし、1段階：円細胞、1糸状偽足、2段階：円細胞、1糸状偽足以上、3段階：偽足をもつ偏平細胞及び多角形の十分に伸展した細胞、4段階。結果は図18に示され、0.001 picomoles/cm²と同程度に低いレベルで、ほとんど完全な伸展反応を促進するに十分であることを示している；このことは、特に4段階の細胞のデータから立証され、0.001 picomoles/cm²は段階4の細胞の4.2%に結

特表平5-502998 (24)

果を与えたのに対し、 $1.0 \text{ picomoles/cm}^2$ は、段階 4 の細胞の 81% に結果を与えていた。これらのことから、細胞反応は、ペプチドの表面密度に依存するが、表面に強い（およそ最大の半分）反応を与えるには $0.001 \text{ picomoles/cm}^2$ で十分である。

例 14 - グリコフェーズガラス-ペプチドが結合することができる基準細胞非付着基質

本例は、グリコフェーズガラスの細胞付着が乏しいことを説明するために含めてある。例 15-19 に結びつけると、ペプチドが別の方法で細胞非付着性のまたは細胞付着性に乏しい基質に付着されるときに得ることができる有利な細胞型の特性が明らかにされる。

グリコフェーズガラスは、例 6 の方法で作られた。この表面の細胞伸展は、血清の存在、非存在の両方で測定され、その結果は下に表してある。細胞はヒト包皮織維芽細胞 (HFF) 、ヒト臍静脈内皮細胞 (HUVEC) 、ヒト血小板 (Plt) 、及び $5 \mu\text{m}$ アデノシンジホスファートで予め刺戟したヒト血小板 (Prestim Plt) であった。HFF 及び HUVECs は、 54 nM の EGTA を含む PBS 溶液で非酵素的に取り入れ、遠心分離にかけ、正常な培地または、無血清伸展分析のために 2 mg/ml の熱-不活性化血清を含む培地に再懸濁した。細胞伸展の範囲を決めるため、細胞は基質上で 4 時間培養され、以前に述べた方法で伸展細胞の百分率が測定された。血小板伸展は、PRPP を各基質に添加し、10 分間培

表 3

細胞の型	伸展 % 血清あり	伸展 % 血清なし
HFF	9	1
HUVEC	8	1
Plt	0	N. D.
Prestim Plt	0	N. D.

例 15 - 繊維芽細胞及び血小板ではない内皮細胞の付着を支持する RGD 材料により結合されたグリコフェーズガラス

ペプチド G R G D Y は、例 6 に記載のように、グリコフェーズガラス表面に結合された。細胞伸展分析は、例 14 に記載のように実施された。細胞伸展は測定され、表 4 に報告されている。この材料は、内皮細胞の封入が望ましいが血小板の付着が有害である場合に血管移植用として有用であろう。

表 4

細胞の型	伸展 % 血清あり	伸展 % 血清なし
HFF	80	81
HUVEC	62	55
Plt	0	N. D.
Prestim Plt	0	N. D.

例 16 - 繊維芽細胞及び血小板ではない内皮細胞の付着を支持する YIGSR 材料により結合されるグリコフェーズガラス

ペプチド G Y I G S R Y はグリコフェーズガラス表面に結合された。YIGSR は、細胞付着を促進する CAM ラミニン内の配列である (Graf et al., 1987, *Cell*, 48 : 989-996)。細胞伸展は、例 14 に記載の方法で測定された。この材料は、内皮細胞の封入が望まれるが、血小板の付着が有害な場合に、血管移植用に有用であろう。結果は表 5 に示されている。

表 5

細胞の型	伸展 % 血清あり	伸展 % 血清なし
HFF	64	59
HUVEC	79	73

Plt	0	N. D.
Prestim Plt	0	N. D.

例 17 - 繊維芽細胞と上皮細胞の付着を助けるが血小板の付着は助けない PDSGR - 材料と結合させたグリコフェーズガラス

ペプチド G P O S G R Y をグリコフェーズガラスの表面に結合させた。PDSGR は、細胞付着活性を有する (Kleinmanら, 1989, *Arch Biochem Biophys.*, 272 : 1 : 39-45) ラミニン中に発見された配列である。細胞の伸展は、例 14 中で記述された手順によって測定した。結果は、表 6 に示されている。この材料は、内皮細胞の侵入が望ましいが、血小板の付着は有害である血管移植に有利であると考えられる。

表 6

細胞型	血清の存在下の 伸展率, %	血清なしでの 伸展率, %
HFF	66	64
HUVEC	66	50
Plt	0	N. D.
Prestim Plt	0	N. D.

例 18 - 内皮細胞の付着を助けるが線維芽細胞または血小板の付着を助けない REDV - 材料と結合させた

特表平5-502998 (25)

グリコフェーズガラス
ペプチド G R E D V Y をグリコフェーズガラス表面に結合させた。フィブロネクチンの配列情報に由来する配列 R E V D は、Humphries ら (1986, *J. Cell Bio.*, 103: 62637-2647) によって b 1 6-f 1 0 細胞の付着を促進するが、BHK 線維芽細胞の付着は促進しないことが示された。細胞の伸展は、例 1 4 に記述した手順によって測定した。結果は、表 7 に示されている。この材料は、内皮細胞の侵入は望ましいが、線維芽細胞と血管平滑筋細胞の侵入と血小板の付着が有害である血管移植に有利であると考えられる。

表 7

細胞型	血清存在下の伸展率, %	血清なしでの伸展率, %
HFF	9	2
HUVEC	79	69
Plt	0	N. D.
Prestim Plt	0	N. D.

例 1 9 - H U V E C または血小板の伸展を助けないが軸索突起の生成を助けるはずである I K V - A V 材料を結合させたグリコフェーズガラス

ペプチド G I K V A V をグリコフェーズガラスの表面

ポリエチレンフタレート (P E T) に固定化した。その結果得られたフィルム (P E T / P E G) は修飾されていない P E T よりもはるかにぬれやすくなってしまっており、細胞の付着と伸展を支持しなかった。ペプチドをグラフトする手順において使用された溶剤対照として、P E T / P E G をジオキサン中で 10 分間抽出した。血管の組織中に見出され、血管移植片と相互作用を起し得るので、ヒト血管平滑筋細胞 (H V S M C) もこれらの P E T / P E G をベースとした材料の試験に組入れられた。伸展細胞の百分率は例 1 4 に記述された手順によって決定された。結果は、表 9 に示されている。HFF, HUVEC および H V S M C の伸展は、血清を補添した培地の存在下で定量した。

表 9

細胞型	血清の存在下での伸展率, %
HFF	0
HUVEC	0
H V S M C	0
Plt	0
Prestim Plt	0

例 2 1 - 線維芽細胞と内皮細胞の付着を助けるが、血

に結合させた。ラミニンの配列情報に由来する I K V A V 配列は、Tashiro ら (1989, *J. Bio. Chem.*, 264: 2716174-16182) によっていくつかの細胞型の細胞付着は促進するが伸展は促進せず、神経細胞型の軸索突起の生成は促進することが示された。細胞の伸展は、例 1 4 に記述された手順によって測定された。結果は表 8 に示されている。この材料は、神経細胞の侵入と軸索突起 (neurites) の生成が望ましい神経細胞における移植に利点があると考えられる。

表 8

細胞型	血清の存在下での伸展率, %	血清なしでの伸展率, %
HFF	47.4	42.5
HUVEC	11.2	0
Plt	0	N. D.
Prestim Plt	0	N. D.

例 2 0 - ポリエチレングリコールが固定化されているポリエチレンテレフタレート-ペプチドを結合させることができる細胞-非付着性高分子基質 (P E T / P E G)

本明細中で後に記述される溶液処理技術を用いて分子量 18,500 のポリエチレングリコール (P E G) を、

小板や血管平滑筋細胞の付着を助ける P G D - 材料を結合させた P E T / P E G

ペプチド G R G D Y は、例 1 5 によけるのと同じ化学的手段によって、例 2 0 の P E T / P E G の表面に共軸結合させた。HFF, HUVEC および H V S M C の伸展は、血清補添培地の存在で定量された。細胞伸展率は、下の表 1 0 に示されている如くであった。この材料は、内皮細胞の侵入は望ましいが、血小板の付着が有害である血管移植に有利であると考えられる。

表 1 0

細胞型	血清の存在下での伸展率, %
HFF	100
HUVEC	71
H V S M C	0
Plt	0
Prestim Plt	0

例 2 2 - 内皮細胞の付着を助けるが線維芽細胞、血小板または血管平滑筋細胞の付着を助ける R E D V - 材料を結合させた P E T / P E G

ペプチド R E D V を例 2 0 の P E T / P E G 表面に結合させた。HFF, HUVEC および H V S M C 展着は血清補添培地の存在下で定量された。細胞伸展率は、下

特表平5-502998 (26)

記の表1-1に示されている。この材料は、内皮細胞の侵入が望ましいが、線維芽細胞と血管平滑筋細胞の侵入と血小板の付着が有害である血管移植に有利であると考えられる。

表 1-1

細胞型	血清の存在下での伸展率, %
HFF	0
HUVEC	78
HVSMC	0
Plt	0
Prestim Plt	0

例2-3-HUVECまたは血小板の伸展を助けないが、HFFの伸展を助け軸索突起の生成を助けるはずであるIKVAV-材料を結合させたPET/PEG

ペプチドG1KVAVYを例2-0のPET/PEGに結合させたラミン配列情報から由来したIKVAV配列は、細胞付着を促進するがいくつかの細胞型の伸展を助けず、Tashiroら(1989, J. Bio. Chem., 264: 27 16174-16182)の神経細胞型の軸索突起の生成を助けることが示された。細胞伸展率は例1-4に記述された手順によって測定され、表1-2に示されている。この材料は、神経細胞の侵入と軸索突起

いことの結果として、血漿蛋白質の吸着に抵抗することが観察されている〔25〕。いくつかの研究グループが、生体適合性、すなわち非付着表面を得る探究における修飾剤としてPEOまたはPEG(ポリエチレングリコール)を使用している。ポリマー表面をPEOで修飾するために種々の方法が使用されている。これらの中には、PEOをPET〔26, 27〕、ポリウレタン〔28〕やポリビニールアルコール〔29〕のようなベースポリマーと共有結合でグラフトさせること、たれ下っているPEO鎖を有するモノマーの重合〔30, 31〕、ブロック共重合によるベースポリマーへのPEOの組込み〔32, 33〕、またはブロックの1つがPEOである典型的にAB乃至ABA型のブロック共重合体であるPEOを含む界面活性剤の直接の吸着〔25, 34〕を含む技術がある。これらの技術は、大半が比較的低分子量(5000ドルトン未満)のPEOを利用しておらず、ごく僅かが比較的高分子を使用しているに過ぎない〔26, 27, 34〕。

上述の技術のうち若干は、修飾されたポリマーの表面において、納得できる程度に首尾よく細胞の相互作用を減少させるが、それの大半は、必要な表面修飾を得るために多くの工程が必要である。さらに、それらはベースポリマー表面上の反応性の物質の構造と入手性によって制約され、多くの場合、各ベースポリマーの修飾について特異的である。

の生成が望ましい神経組織の移植片用として有利であると考えられる。

表 1-2

細胞型	血清存在下の伸展率, %
HFF	100
HUVEC	0
Plt	0
Prestim Plt	0

例2-4-ポリエチレンオキサイドや他の水溶性ポリマーを高分子生体材料の表面に組込む溶液技術

血液との接触が関与する適用において現在使用されている生体医学ポリマーは、径の小さい血管移植において使えるに足るだけ、血栓形成作用を持たないことが証明されていない。血小板や他の血液細胞の付着が、直径が小さい移植の開孔性が低い主な理由である。そして、本態様の一側面は、血液成分の生体ポリマーとの相互作用を減少させることである。血小板、白血球、線維芽細胞などの付着は、ポリマー表面への蛋白質の吸着によって媒介されているので、蛋白質のこれらのポリマーとの相互作用を減少させる方法が採用された。

ポリエチレンオキサイド(PEO)表面は、それらの親水性が強いこと、鎖の可動性ならびにイオン電荷がな

本発明は、PEOと他の水溶性ポリマー(WSP)をベースポリマー(BP)の表面に組込む技術に関する。本技術は一般性があり、その表面に組込まれるべきWSPを溶解する溶剤中のBPの溶解の性質によってのみ制約を受けるにすぎない。本技術は、修飾されるべき高分子用具や材料(BPから作った)を、BPとWSPの共通の溶剤である液体中に浸漬することから成る。BPと溶液の界面は、次に軟化し始め、その結果BPのポリマーネットワークにゆるみを生ずる。この間に、WSPの分子が半溶解に界面中に拡散する。一定時間が経過した後、反応系はBPを溶かさないが、浸漬溶剤と相互に溶解し得る水で停止させる。この結果、その界面の急速な崩壊を生じ、BPネットワーク内のWSPの鎖を包み込む。このようにして、BPは非共有結合的にではあるが安定にWSPで修飾される。水と異なる別の停止用溶剤も使用できるかもしれない。その場合、停止溶剤はWSPを溶解するがBPを溶解しない。水以外の停止溶剤の例にはPET-TIENs用にメタノール、エタノール、アセトン、ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン、そしてPMMA-PIPNs用にエタノールとメタノールがあるが、これらに限られるものではない。代替法として、停止させるためにWSPもBPも溶解させない溶剤を使用し、続いてWSPを溶解させるがBPを溶解させない溶剤によってすぐことが可能である。さらに代替法として、系を乾燥し、次に停止溶媒中

特表平5-502998 (27)

ですすぎ過剰の溶剤を除くこともできる。BP中のWSP鎖の提案された取込みの模式は、図19に示されている。(BPが全部溶けることを防ぐための)適當な希釈、WSPの濃度、処理時間のような取込み過程の条件は勿論適切に修飾された安定な物理的な内部に入り込んだネットワーク(PIPN)を得るために最適化される必要がある。比較的短鎖を有するWSPの分子(すなわち、低分子)は、BP上の崩壊しつつあるネットワークによって効果的に包みこまれることができず、やがてネットワークから拡散してしまうので、WSPの分子量もある程度重要であるはずであることも結論される。同様に極めて大きな分子(すなわち高分子量)には質量輸送制限があり、BPの表面に効果的に組込まれない。

1つのブロックが疎水性で、他のブロックが親水性の場合の2ブロック界面活性剤共重合体の使用のみを強調する技術が文献に記述されている。その技術が生体材料に適用され得ると述べられているが、データや例も提出されていない。本発明の技術は、BP表面に組込まれるべきすべてのホモポリマーに、一般的に適用でき、それ自体、界面活性剤の性質をもった2ブロック共重合体に限られるものではない。

材料と方法

PET上の物理的な内部に入り込んだネットワーク(PZPN)の調製。

PIPN技術を用い、PET(Mylar, DuPont)の薄

いフィルムを使用して表面修飾を行い、PEO(分子量5000, 18500と10000g/mol, Polyscience社)、PVP(分子量24000g/mol, Aldrich Chemical社)、およびPEOX(分子量439000g/mol, Dow Chemical社, #XA10874.05)を組み込んだ。PETフィルムは、使用前に室温でアセトンで少くとも24時間抽出した。トリフルオロ酢酸(TFAA, Morton Thiokol社)は、それがPETならびにWSPsをすべて溶解するので処理溶媒として使用された。100%TFAAは、PETを極めて速やかに溶解することが分ったので、BPが十分な時間処理されるためには、希釈が必要とした。高粘性であるため、0.2g/molで使用してPEO 10000とPEOXを例外としてWSPsは、0.49g/molの濃度で脱イオン達成水(DIFW)の溶液を調製した。TFAAを18-20%に希釈することが、PETフィルムの溶解を防ぎ、水で停止させた後の光学的透明度を維持するのに適していることが見出された。TFAAはWSP水溶液を加えることによって、適切な濃度に希釈された。次に、PETフィルムを希釈TFAA中のWSP溶液に加え、室温で定期的にゆるやかに廻しつつ30分間放置した。その混合物を、次に、大過剰のDIFWで停止させ、PIPNを製造した。次に、フィルムはDIFW中に移し、保存した。水は、定期的に取換えて、BP表面から溶脱した可能性がある

WSPをすべて除くために、定期的に変更した。対照は、DIFWで同じ希釈をしたTFAAで、但しWSPなしで処理した。

Pellethane上のPIPNの調製

Pellethane(Dow Chemical社, #2363-80AE)は、ペレットとして入手した。縫造ナイフを使用して、50ミリの厚さのフィルムを縫造するために、テトラヒドロフラン(THF)中50g/molの濃度のPellethaneの溶液を使用した。これらのフィルムは、縫造後60-70°Cでオープン中で硬化させ、溶剤を蒸発させた。多数の異なる溶剤を試して、THFがPellethane上PIPНの発生に適していることが見出された。PIPНは、以下に説明する理由から、PEO 18500WSPを使用してのみ造られた。対照処理(すなわち、WSPなしでの溶媒希釈)から、THFをDIFWで40%に希釈することが、停止を行った際、フィルムの構造的完全性と光学透明度を維持するのに必要であることが分った。PEO 18500は、室温でTHF中に不溶であったが、60°Cでは可溶であった。したがって、Pellethaneのための表面修飾は、この温度で行われた。処理溶液は、THF 40%, PEO 18500水溶液、20%、残りの40%はDIFWから成立っていた。この溶液をPEOが溶解するまで60°Cに加熱し、Pellethaneフィルムを15-25分間溶液に浸漬した。この手順の処置は、オープン中60°Cで行

った。次に、溶液は過剰のDIFWで停止し、処理したフィルムを水中に移して貯蔵した。PEOなしで同じTHF希釈において、対照の処置を行った。

PMMA上のPIPНの調製

PMMA(中程度の分子量、Aldrich Chemical社)は、粉末として入手した。それを50g/lでアセトンに溶解し、Pellethaneの場合と同様にフィルムに縫造した。アセトンはPMMAに対する修飾溶媒として使用した。アセトンの60%への希釈が本工程に適していた。処理溶液は、アセトン、60%、PEO 18500水溶液、20%、(PEO 40%水溶液)、および残りの20%は水から成立っていた。処理は室温で15-25分行い、そのあとで水で停止させた。修飾したフィルムをもう一度再び水中で貯蔵し、定期的に水を取換えた。対照試料も処理した。

表面分析と特徴づけ

修飾表面上の接触角度は、あつらえて作った装置で測定した。空気接触角度は、修飾操作の後、親水性のなんらかの変化を決定するために水面下で測定した。

ポリマー表面上のESCA分析(VG Instruments, 英国)を修飾手順を行った後、BP表面上のWSPの存在を決定するために行った。

PIPН表面上の生物学的反応の測定

修飾表面上の蛋白質吸着試験は、アルブミンを用いて行った(BSA, Sigma)。蛋白質は、ヨードビーズ技術

特表平5-502998 (28)

(36) を用いて ^{125}NaI (ICN Biomedicals 社) で放射標識した。標識アルブミンの比活性は $53.9 \mu\text{Ci}/\text{mg}$ であることが分った。小さいフィルム ($0.5 \times 0.5 \text{ cm}^2$) を修飾ポリマーから切取り、リン酸緩衝食塩溶液 (PBS) 中 0.094 mg/ml の濃度で 37°C で 4 時間インキュベートした。インキュベーション後、フィルムを吸着溶液と同じ濃度の PBS 中のアルブミン溶液ですすぎ、そのフィルムを吸着を起した蛋白質についてのガムマーカウンター (Isotopflex, ICN Micromedic Systems) 中でカウントした。試料は、すべて 4 重に測定を行った。

短期間での血液との適合性は、必要な調節された流量とこの試験に必要とされる剪断環境をととのえる平行平面フローチェインバー中で試験した。フローチェインバーは、図 20 中に示されている。表面を修飾されたフィルムはフローチェインバーのベースを形成しているガラスカバースリップ ($24 \times 50 \text{ mm}$) 上にのせた。非該当材料表面は、すべて被験材料表面に接触する前に、血小板があらかじめ活性化されるのをさけるために、血液が接触する前にアルブミンで被覆した (4 g/dl , HEPES 緩衝液)。ヘパリン添加 (2 単位/ml) で凝血を防いだ新鮮な採取ヒト全血をこれらの試験に使用した。血小板は、静脈穿刺時に蛍光染料、メカブリン ($10 \mu\text{M}$) で標識した。血が流れている間に、血小板の付着と血液の生成を可視化させるために、そして試験される表面上の付着血小板数を決定するために、エビ蛍

光顕微鏡法とデジタル造影処理を使用した。造影の認識システムは別の場所で記述されている (37, 38)。血流は、 $100/\text{s}$ の壁剪断速度で 10 分間維持された。

修飾されたポリマー表面上を血が流れた後、フィルムをリン酸緩衝食塩水 (PBS) 中で静かにすすぎ、次に、PBS 中の 2.5% グルタールアルデヒド溶液で一夜固定した。次に血液と接触した表面を走査電子顕微鏡法 (SEM) で精査し、血小板付着ならびに付着した血小板の形態を評価し、異なる表面上の血小板の伸展と活性化の程度を調査した。

修飾ポリマー表面への細胞の付着を防ぐ上での PEO や他の WSPs の効果のさらにより厳密な試験として、ヒト包皮線維芽細胞 (HFF) の細胞培養を、これらの表面上で遂行した。修飾したポリマー上のこれらの細胞の蛋白質の吸着、したがって付着と伸展を減少させる上でこれらの表面の効果を決定するために、付着および伸展の検定を行った。

結果と考察

修飾した表面上の接触角度の測定によってこれらの表面の修飾操作前後の相対的親水性の示唆が与えられた。いかなる測定を行う前にもポリマーは、すべて水中で少くとも 1 週間抽出された。表 1-3 には修飾した PET 表面上の接触角のデータが示されている。表 1-4 には Pellethane についての接触角データが示され、表 1-5 には、PMMA についてのデータが示されている。

表 1-3
修飾 PET 表面についての接触角

修 饰	接 触 角
無処理 PET	65.3 ± 0.9
対照 PET	50.5 ± 2.8
PET - PEO 0 0 0 0	14.9 ± 2.8
PET - PEO 1.8 5 0 0 0	19.4 ± 3.6
PET - PEO 1 0 0 0 0 0	21.2 ± 2.3
PET - PVP 2 4 0 0 0	20.6 ± 2.8
PET - PEO X 4 3 9 0 0 0	22.2 ± 2.4

表 1-4

修 饰	接 触 角
無処理 PELL	44.9 ± 3.1
対照 PELL	35.2 ± 2.7
PELL - PEO 1 8 5 0 0	24.6 ± 4.3

表 1-5

修 饰	接 触 角
無処理 PMMA	59.6 ± 3.0
対照 PMMA	37.0 ± 3.3
PMMA - PEO 1 8 5 0 0	22.3 ± 1.8

接触角の減少は、ポリマー表面の親水性の増加を示している。無処理 PET は、アセトンで抽出されただけの処女ポリマーを表している。対照 PET は無処理ポリマーよりも小さい接触角を示し、TFAA での処理は、事実その親水性を少し増加させることができている。WSP で処理したフィルムは、親水性のはるかに大きな増加を示し、PET の表面にそれぞれの WSPs の存在を示している。

Pellethane (PELL) 上の接触角のデータは PET 表面についての場合と同じ傾向を示している。PEO 1 8 5 0 0 で修飾した Pellethane は、相当する PET 表面に対するのと同様な接触角を示している。さらに再び同じ傾向が PMMA についても得られている。したがって、WSP で修飾した表面は、互いに極めて近い接触角をもつていて、同様な程度の親水性と同様な界面エネルギーをもっていることが示唆される。

修飾された PET 表面上の放射標識アルブミン吸着の分析により、図 21 に示されている結果が与えられた。データは、明らかに PEO 1 8 5 0 0 で修飾された表面についてだけアルブミン吸着の鋭い低下を示している。この表面については、対照の吸着の約 80% の減少が観察されている。PVP 修飾表面は、約 20% の減少を PEO 修飾表面は対照の約 30% の減少を示している。PEO 5 0 0 0 と 1 0 0 0 0 0 で修飾した表面は有意に異なる吸着水準を示さない。このデータは、PEO

500はポリマー表面において蛋白質の吸着を防ぐに足るだけの大きな分子量ではなく、そして、PEO 100000は嵩だかすぎて、それが蛋白質の吸着を防ぐことができるようになる配置で、ポリマー表面に効果的に組込まれることができないことを示唆すると考えられる。

全血がポリマー表面上を流れる間にエビ萤光顕微鏡ビデオによって得られた修飾PETに対する血小板の付着の分析を図22に示してある。PEO18500で修飾された表面は、血小板付着において、対照値の約5%への減少を示している。PEOXで修飾した表面も対照水準の約10%への有意な減少を示している。PEO 100000で修飾した表面は約30%への減少を示しており、PEO5000とPVP修飾表面は、対照値の40-80%の減少を示している。これは、PEO 18500で修飾したPETについての蛋白質吸着データとよく相關している。PEOXで修飾されたPII上での血小板付着の有意な低下は説明されていない。

10%ウシ胎児血清を補添したDulbeccoの変更イーグル培地(DMEM)中のヒト包皮線維芽細胞の付着と伸展が、WSPで修飾した表面の蛋白質吸着を防ぐ上の有効性の試験として使用された。細胞は、PET、Pelletthane、PMMAで修飾した表面上に既知の濃度で接種され、そして接種4時間後伸展細胞を計数しその後は、定期的に集密状態に達するまで計数した。

た。細胞はこれらの修飾した表面にさらにきびしい条件下で接種した。(すなわち、PETの接種密度の2.5倍)これらの条件下では、無処理のPETのような納得できる程度に付着性な基質は2日未満で集密状態に達するであろう。Pelletthaneについて得られた結果を図4に示してある。そして、PMMAについての結果は、図25に示してある。また再び、PEO18500は、これらの基質上の細胞伸展と生長を首尾よく減少させていく。処理溶媒の濃度が増加するにつれて細胞付着は減少し、PEO18500がベースポリマーによりよく組込まれることを示している。

異なる修飾表面についての表面親水性はひろく変動する細胞応答を生じ、表面の可動性と組込まれたポリマーの適切な鎖の長さは、ポリマーの表面において細胞相互作用の結果を決定する重要な要因であることを示している。

これらの結果は、ポリマーのシステムの修飾にPIPN技術が一般的に適用可能であり、その上、蛋白質吸着、したがって生物材料表面における相互作用を阻害するPEO18500のことのほかすぐれた能力を示している。この技術の既存の生物医学的ポリマーへの応用の可能性は測り知れない。簡単な溶液工程なので、あらかじめ作られた用具はWSPの適切な溶液に浸漬し、次に水のような用具に対して溶解性のない非溶媒に移すことによって、簡単に修飾することができる。

PETで修飾したフィルムは、25日間水で抽出した後30000細胞/cm²を接種した。最も劇的な結果は、ここで、PET上のPEO18500で修飾した表面について得られた。図23においてみることができるよう、PEO18500で修飾したPET表面を除き、すべての表面が最初の接種後5-10日以内に集密状態に達した。9日、および15日目に再接種したにもかかわらず、PEO18500は30日を越えた日数がすぎてしまえども、細胞はこの表面に付着しない。集密状態に達する表面の中では、PEOXで修飾した表面は応答が最もおそいが、結局は集密状態に達している。これらの結果は、蛋白質吸着と血小板付着実験から得られたデータと厳密に一致している。PEOX表面についての結果は、血液と接触する適用においてはこのような表面は、短期間においては適切に挙動するが、接觸時間が長くなると、結局は血栓形成性に変る可能性があることが示唆されていると思われる。

これらの結果は、PIPNの形でポリマー表面へ含浸させたとき、蛋白質吸着、それゆえ細胞の相互作用を防ぐ上でPEO18500の有効性と適切性を示している。これらの結果の成行きとして、PelletthaneとPMMAをPEO18500でのみ修飾して、PETについての早期の結果を再確認することに決定した。溶解など適切な条件を決定した後、これらのポリマーにPEO 18500を含浸させ、これらの表面上にPIPNを得

PIPNは、最低5、6週間にわたって、極めて安定のように思われる。(低い細胞付着と蛋白質吸着を示した)PEO18500で修飾された表面についての細胞付着と蛋白吸着の実験は、これらのPIPNsの調整後、それぞれ25日と20日間行われた。これら20日から25日の期間を通じて、それらは連続的に水中で抽出された。

この工程と水溶性ポリマーPEG(PEO)(好ましくは分子量18500)の応用には、血管移植、カテーテルやペーシングリードのような血流と接触する生体材料を含む領域がある。その上、これらの修飾ポリマー表面上の反応性のPEO末端基を、特別な細胞型のみを付着するであろう表面を产生するための適切な生体特異的ペプチド(本明細の他の場所で述べられた)の結合場所として役立てることが可能である。例えば、血管移植のような適用の場合には、内皮細胞が付着細胞とされるかもしれない。現在市販されている血管移植の約半分は、この例の主たる焦点であるDarcon(PET)から作られている。他の応用には、バイオセンサー膜、眼内レンズ(PPMMA)のような細胞付着が望ましくない組織と接触する材料が含まれる。材料はまた、非吸着性の支持体が特異的吸着リガンドの結合にとって望ましい蛋白質のアフィニティクロマトグラフィーでの使用のために作ることができる。非吸着性チューブと袋も、蛋白質と液体工程の他の領域においても有用かもしれない。本発明

引用文献

の技術は、バイオテクノロジーと食品加工において使用するための限外濾過膜の製造、または、処理に応用されると考えられる。極めて清潔な水のシステム（例えば、ミクロエレクトロニクス産業において使用されるよう））、そして、多分海洋の付着物がつかない表面のような非生物的応用もあると思われる。

PET表面へのフィブリノーゲンの吸着、PMMAとPellethaneの表面へのアルブミンとフィブリノーゲンの吸着；これらの表面上のPEOや他のWSPsの存在を示すESCAデータ；PellethaneとPMMA表面についての血液接触、ならびに、これらの表面における血小板の形態を評価するために、血液と接触した後のSEM分析；そして、最後にさらにマウスでの皮下移植のようなin vivo試験についてさらに検討を計画している。

PET-P EO 18500に関する予備的データは、細胞付着を防ぐのに効果的であることが示された。対照1週間のPET移植片は、広範囲な線維形成と被包形成を起したが、相当するPEO 18500で修飾したPET表面は、最小限の細胞付着状態で自由に浮いているのが見出された。

以下の参考文献は、他の場所で引用された文献と同様に、引用された理由により、ここに参考として関係部分に組込まれている。

13. Hynes, R. O. (1987). Cell. 48: 549-554.
14. Singer, et al., (1987). J. Cell. Biol. 104: 573-584.
15. Cheresh, A. (1987). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 6471-6475.
16. Variani, et al., (1986). In Vivo. 22: 575-582.
17. Aubert, et al., (1987). J. Biomed. Mater. Res. 21: 585-602.
18. Ohison, et al., (1978). FEBS Letters. 93, 5-9.
19. Woods, et al., (1986). EMBO J., 5: 665-670.
20. Streeter, et al., (1987). J. Cell. Biol. 105: 507-515.
21. Paul, et al., (1976). J. Appl. Pol. Sci., 20: 609-625.
22. Humphries, et al., (1986). J. Cell Biol. 103: 2637-2647.
23. Mohr and Pommerning, (1985). Affinity Chromatography: practical and theoretical aspects. Chapter 4.
24. Costello and McCarthy (1987). Macromolecules. 20: 2819-2828.
25. J. H. Lee, J. Kopecek, and J. D. Andrade. J. Biomed. Mater. Res. 23, 351. 1989.
26. N. P. Desai and J. A. Hubbell. Proceedings of the ACS Division of Polymeric Materials: Science and Engineering. 62, 731. 1990.
27. W. R. Combotz, W. Guanghui, and A. S. Hoffman. J. Appl. Polym. Sci. 37, 91, 1989.
28. N. Chisato, K. D. Park, T. Okano, and S. W. Kim. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs 35: 357. 1989.
29. M. V. Sefton, G. LLanos, and W. R. Ip. Proceedings of the ACS Division of Polymeric Materials: Science and Engineering. 62, 741. 1990.
30. S. Nagaoka and A. Nakao. Biomaterials 11, 119. 1990.
31. Y. Mori, S. Nagaoka, H. Takiuchi, et al. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs 28, 459. 1982.
32. E. W. Merrill, E. W. Salzman, S. Wan, et al. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs 28, 482. 1982.
33. S. K. Hunter, D. E. Gregonis, D. L. Coleman, et al.. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs 29, 250. 1983.
34. C. Maechling-Strasser, Ph. Dejardin, J. C. Galin, and A. Schmitt. J. Biomed. Mater. Res. 23, 1385. 1989.
35. J. H. Chen and E. Ruckenstein. J. Colloid Interface Sci. 132, 100. 1989.

36. M. K. Markwell, Anal. Biochem., 125, 427, 1982.
 37. J. A. Hubbell and L. V. McIntire, Rev. Sci. Instrum., 57, 892, 1986.
 38. N. P. Desai and J. A. Hubbell, J. Biomaterials Sci., Polym. Ed., 1, 123, 1989.

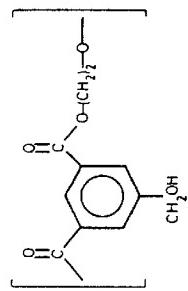
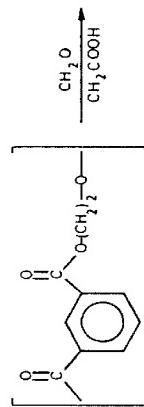


FIG. 1



添書(内容に変更なし)

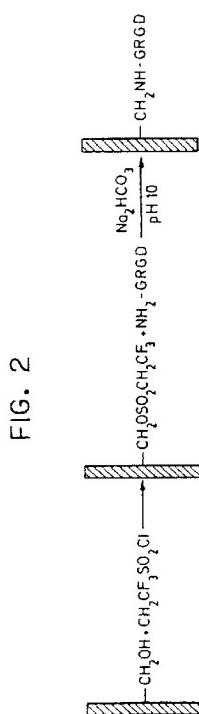


FIG. 2

FIG. 3A



FIG. 3B



FIG. 4

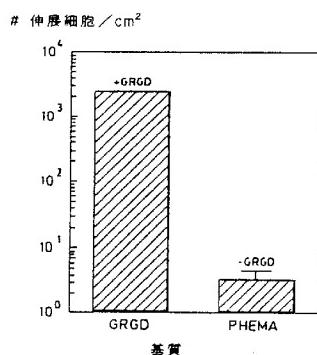


FIG. 5

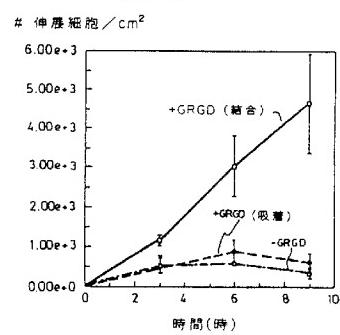


FIG. 8

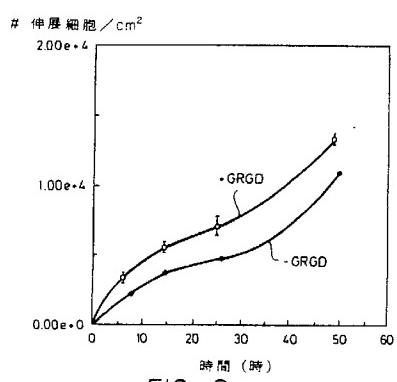


FIG. 9

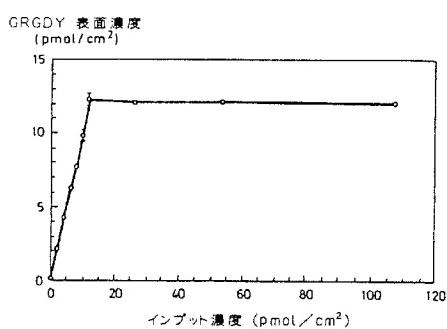


FIG. 6

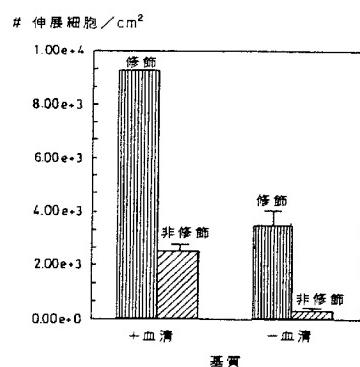


FIG. 7

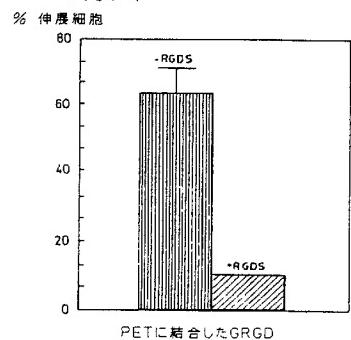


FIG. 10A

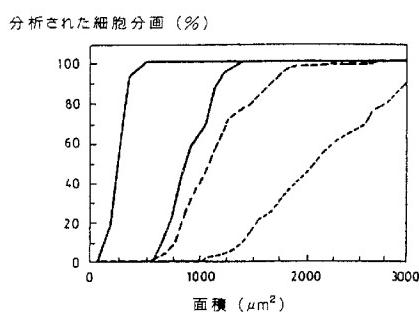


FIG. 10B

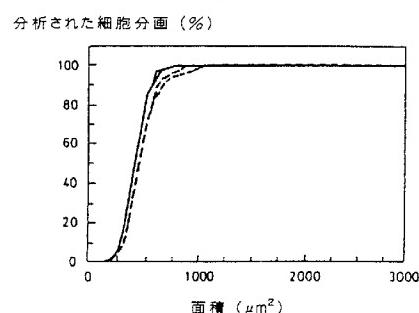


FIG. 10C

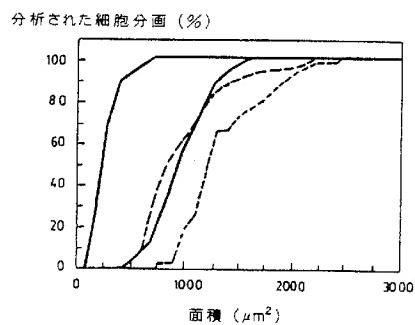


FIG. 10D

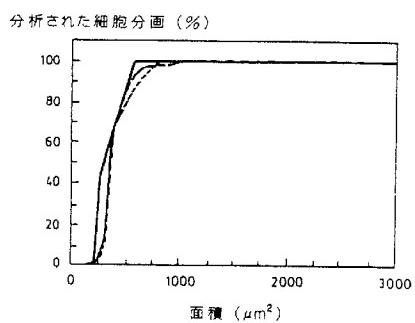


FIG. 11

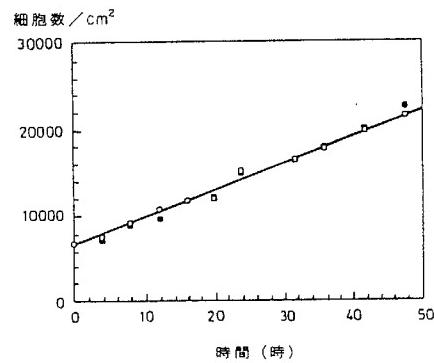


FIG. 12A

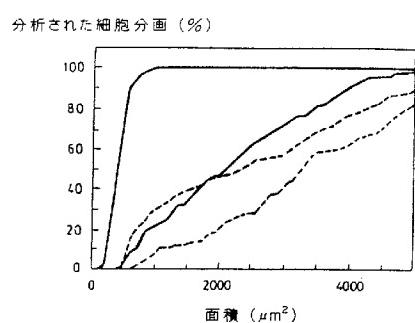


FIG. 12B

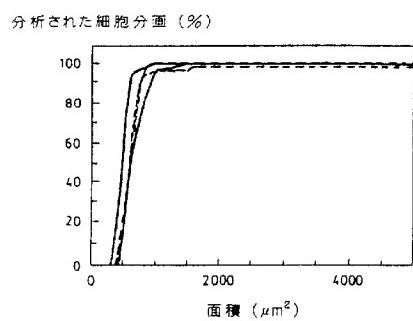


FIG. 12C

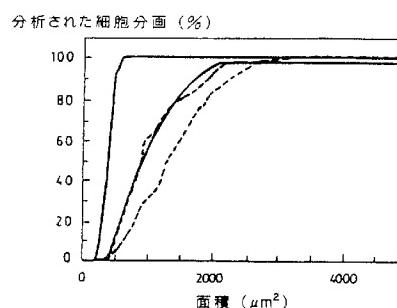


FIG. 12D

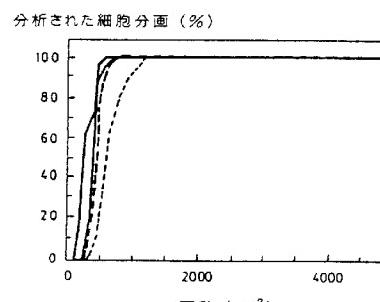


FIG. 13A



FIG. 13C



FIG. 13B



FIG. 13D



FIG. 14A



FIG. 14C



FIG. 14B



FIG. 14D



FIG. 15A



FIG. 15C



FIG. 15B



FIG. 15D



FIG. 16

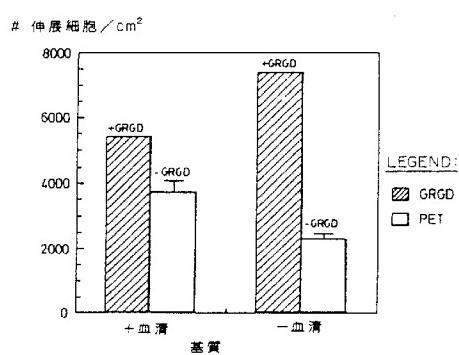


FIG. 17

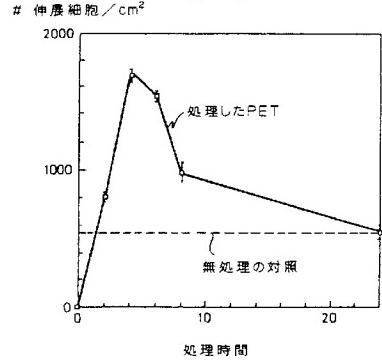


FIG. 18

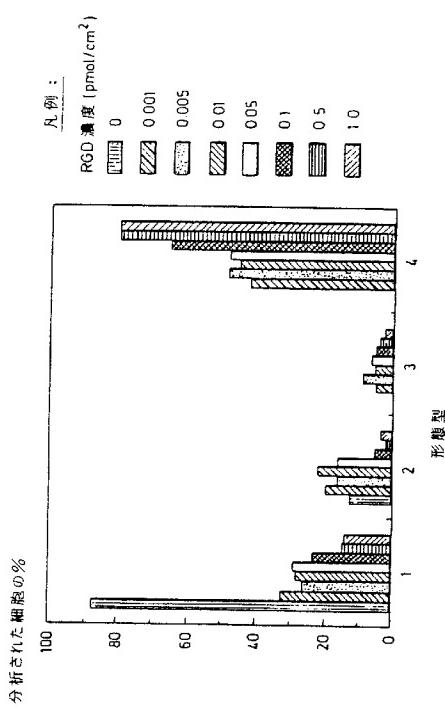


FIG. 19

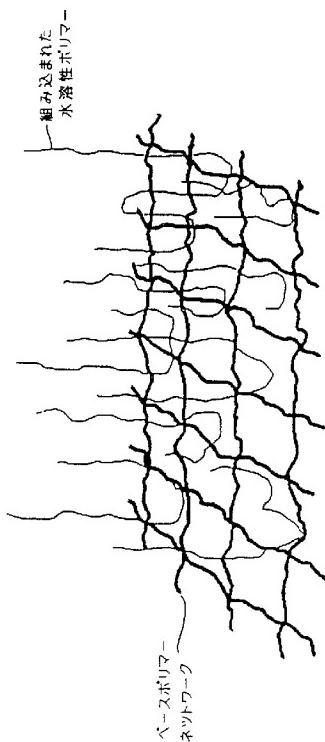


FIG. 21

対照の %

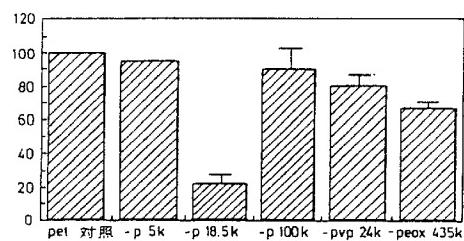


FIG. 22

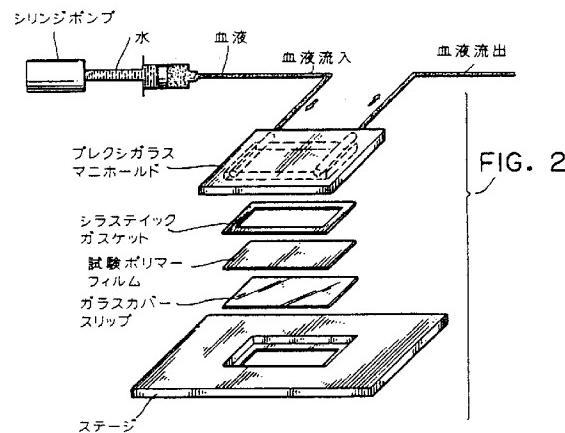
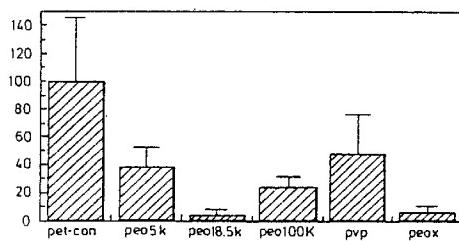
血小板付着、
対照の %

FIG. 20

FIG. 23

集密状態 %

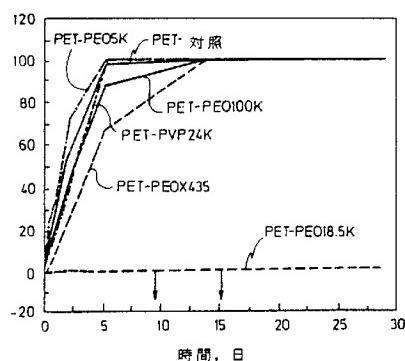
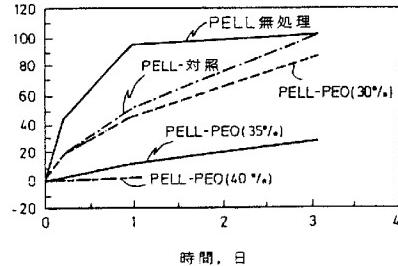


FIG. 24

集密状態 %



特表平5-502998 (37)

手続補正書(自発)

平成4年6月10日

特許庁長官殿



1. 事件の表示

平成2年特許第513835号
PCT/US90/05525

2. 発明の名称

望ましい細胞接着効果をもつ表面

% 集密状態

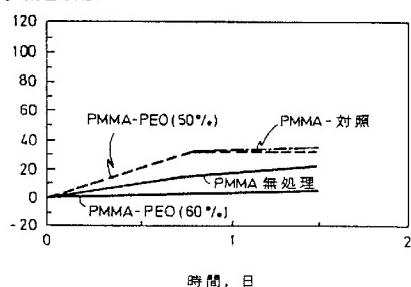


FIG. 25

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人
氏名(名称)

ボード オブ リージェンツ, ザ ユニバーシティ オブ
テキサス システム

4. 代理人

居所 〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号
新大手町ビルディング331
電話 (3211) 3651 (代表)
氏名 (6669) 井理士 渡辺 晃



5. 補正命令の日付

6. 補正により増加する請求項の数

7. 補正の対象

明細書及び請求の範囲翻訳文



8. 補正の内容 別紙のとおり

明細書及び請求の範囲翻訳文の添書(内容に変更なし)

手続補正書(方式)

特許庁長官殿

平成5年1月8日

1. 事件の表示

平成2年 特許第513835号
PCT/US90/05525

2. 発明の名称

望ましい細胞接着効果をもつ表面

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人
氏名(名称)

ボード オブ リージェンツ, ザ ユニバーシティ オブ
テキサス システム

4. 代理人

居所 〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号
新大手町ビルディング331
電話 (3211) 3651 (代表)
氏名 (6669) 井理士 渡辺 晃

5. 補正命令の日付 平成4年12月8日

6. 補正により増加する請求項の数

7. 補正の対象

特許法第184条の5第1項の規定による書面の
特許出願人(法人) 代表者氏名の欄
代理権を証明する書面

図面の翻訳文

8. 補正の内容 別紙のとおり

図面の翻訳文の添書(内容に変更なし)

国際調査報告

International Application No. PCT/US 90/05525

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER If several classification symbols apply, indicate all.
According to International Patent Classification (IPC) or in both National Classification and IPC: C 12 N 5/00
IPC⁵: A 61 L 27/00, C 07 K 17/02, C 07 K 17/10, A 61 F 2/00

II. FIELDS SEARCHED

Classification System Minimum Documentation Searched¹ Classification Symbols

IPC⁵ C 12 N, A 61 L, A 61 F, A 61 K, C 07 K

Documentation Searched other than Minimum Documentation
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched²

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category³ Citation of Document,⁴ with indication, where appropriate, of the relevant passage⁵ | Relevant to Claim No.⁶

P,X	Dialog Information Service, file 155: Medline 66-90/Nov., Medline Acc. No. 900343042, S.P. Massia et al.: "Covalent surface immobilization of arg-gly-asp and tyr- ile-gly-ser-arg containing peptides to well defined cell-adhesive sub- strates", & Anal. Biochem., Jun. 1990, 187(2), p 292-301 see the abstract	1-49
O,X	Dialog Information Service, file 5: Biosis Previews 69-90/Nov., BIOSIS Acc. No. 39130827, S.P. Massia et al.: "Covalently attached GRGD on polymer surfaces	1-49

* General category of cited document.

¹ A general category of cited document.

² A general category of cited document which is not considered to be of particular relevance.

³ A general category of cited document published on or after the international filing date.

⁴ A general category of cited document which may throw doubt on priority claims or which may be relied upon as evidence of another claim or other special reason (as specified).

⁵ A general category of cited document, e.g. exhibition or document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed.

⁶ A general category of cited document published on or before the international filing date.

⁷ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

⁸ A general category of cited document which is not considered to be of particular relevance.

⁹ A general category of cited document published on or after the international filing date.

¹⁰ A general category of cited document which may throw doubt on priority claims or which may be relied upon as evidence of another claim or other special reason (as specified).

¹¹ A general category of cited document, e.g. exhibition or document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed.

¹² A general category of cited document published on or before the international filing date.

¹³ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

¹⁴ A general category of cited document published on or before the international filing date.

¹⁵ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

¹⁶ A general category of cited document published on or before the international filing date.

¹⁷ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

¹⁸ A general category of cited document published on or before the international filing date.

¹⁹ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

²⁰ A general category of cited document published on or before the international filing date.

²¹ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

²² A general category of cited document published on or before the international filing date.

²³ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

²⁴ A general category of cited document published on or before the international filing date.

²⁵ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

²⁶ A general category of cited document published on or before the international filing date.

²⁷ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

²⁸ A general category of cited document published on or before the international filing date.

²⁹ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

³⁰ A general category of cited document published on or before the international filing date.

³¹ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

³² A general category of cited document published on or before the international filing date.

³³ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

³⁴ A general category of cited document published on or before the international filing date.

³⁵ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

³⁶ A general category of cited document published on or before the international filing date.

³⁷ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

³⁸ A general category of cited document published on or before the international filing date.

³⁹ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

⁴⁰ A general category of cited document published on or before the international filing date.

⁴¹ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

⁴² A general category of cited document published on or before the international filing date.

⁴³ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

⁴⁴ A general category of cited document published on or before the international filing date.

⁴⁵ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

⁴⁶ A general category of cited document published on or before the international filing date.

⁴⁷ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

⁴⁸ A general category of cited document published on or before the international filing date.

⁴⁹ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

⁵⁰ A general category of cited document published on or before the international filing date.

⁵¹ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

⁵² A general category of cited document published on or before the international filing date.

⁵³ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

⁵⁴ A general category of cited document published on or before the international filing date.

⁵⁵ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

⁵⁶ A general category of cited document published on or before the international filing date.

⁵⁷ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

⁵⁸ A general category of cited document published on or before the international filing date.

⁵⁹ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

⁶⁰ A general category of cited document published on or before the international filing date.

⁶¹ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

⁶² A general category of cited document published on or before the international filing date.

⁶³ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

⁶⁴ A general category of cited document published on or before the international filing date.

⁶⁵ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

⁶⁶ A general category of cited document published on or before the international filing date.

⁶⁷ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

⁶⁸ A general category of cited document published on or before the international filing date.

⁶⁹ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

⁷⁰ A general category of cited document published on or before the international filing date.

⁷¹ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

⁷² A general category of cited document published on or before the international filing date.

⁷³ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

⁷⁴ A general category of cited document published on or before the international filing date.

⁷⁵ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

⁷⁶ A general category of cited document published on or before the international filing date.

⁷⁷ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

⁷⁸ A general category of cited document published on or before the international filing date.

⁷⁹ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

⁸⁰ A general category of cited document published on or before the international filing date.

⁸¹ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

⁸² A general category of cited document published on or before the international filing date.

⁸³ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

⁸⁴ A general category of cited document published on or before the international filing date.

⁸⁵ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

⁸⁶ A general category of cited document published on or before the international filing date.

⁸⁷ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

⁸⁸ A general category of cited document published on or before the international filing date.

⁸⁹ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

⁹⁰ A general category of cited document published on or before the international filing date.

⁹¹ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

⁹² A general category of cited document published on or before the international filing date.

⁹³ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

⁹⁴ A general category of cited document published on or before the international filing date.

⁹⁵ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

⁹⁶ A general category of cited document published on or before the international filing date.

⁹⁷ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

⁹⁸ A general category of cited document published on or before the international filing date.

⁹⁹ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

¹⁰⁰ A general category of cited document published on or before the international filing date.

¹⁰¹ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

¹⁰² A general category of cited document published on or before the international filing date.

¹⁰³ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

¹⁰⁴ A general category of cited document published on or before the international filing date.

¹⁰⁵ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

¹⁰⁶ A general category of cited document published on or before the international filing date.

¹⁰⁷ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

¹⁰⁸ A general category of cited document published on or before the international filing date.

¹⁰⁹ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

¹¹⁰ A general category of cited document published on or before the international filing date.

¹¹¹ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

¹¹² A general category of cited document published on or before the international filing date.

¹¹³ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

¹¹⁴ A general category of cited document published on or before the international filing date.

¹¹⁵ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

¹¹⁶ A general category of cited document published on or before the international filing date.

¹¹⁷ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

¹¹⁸ A general category of cited document published on or before the international filing date.

¹¹⁹ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

¹²⁰ A general category of cited document published on or before the international filing date.

¹²¹ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

¹²² A general category of cited document published on or before the international filing date.

¹²³ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

¹²⁴ A general category of cited document published on or before the international filing date.

¹²⁵ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

¹²⁶ A general category of cited document published on or before the international filing date.

¹²⁷ A general category of cited document published after the international filing date but before the priority date claimed.

¹²⁸ A general category of cited document published on or before the international filing date.

^{129</sup}

特表平5-502998 (38)

International Application No. PCT/US 90/05525 -

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category	Character of Document, ¹¹ with indication, where applicable, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
	promotes biospecific adhesion on mammalian cells", & Goldstein, W.E., D. Dibiasio and H. Pedersen (Ed.), Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 589, Biochemical Engineering, sixth conference, Santa Barbara, California, US, October 2-7, 1988, XI + 715p., New York Academy of Sciences: NY, NY, US, 0 (0), 1989, 261-270 --	
X	Dialog Information Service, file 351: WPI, WPI Acc. No. 88-351056/49 & JP, A, 63264069 (IDEMITSU KOSAN K.K.) 31 October 1988 see the abstract -- Dialog Information Service, file 351: WPI, WPI Acc. No. 89-1505g/20 & US, A, 7221982 (Y. YAMADA et al.) 7 March 1989 see the abstract --	1-4, 11-15, 17, 26-39 1, 3-5, 11, 12, 26, 42
Y	Analytical Biochemistry, vol. 172, 1988, B.K. Brandley et al.: "Covalent attachment of an Arg-Gly-Asp sequence peptide to derivatized polyacrylamid surfaces: support of fibroblast adhesion and long-term growth", pages 270-278 see the whole article --	1, 4, 11, 12, 23-37, 39
X	EP, A, 0278781 (THE UNITED STATES OF AMERICA) 17 August 1988 see especially page 10, lines 28-39 and claims --	1-5, 7, 11, 12, 17, 18, 20, 21, 23-37, 39, 42
X	US, A, 4614517 (E. ROUSLAHTI et al.) 30 September 1986 see column 2, lines 14-40; column 6, line 3; column 7, line 3 --	1, 3-5, 11, 12, 14, 17, 20, 26- 37, 39, 41, 42
X	Dialog Information Service, file 155 Medline 86-90/Nov., Medline Acc. No. 89380220, K. Tashiro et al.: "A synthetic peptide containing the IKVAV sequence from the A chain of Laminin mediates the cell attachment, migration and neurite outgrowth", J. Biol. Chem., Sep. 25 1989, 264(27), p16174-82, see the abstract --	1-5, 11, 12, 26, 42

Form PCT/ISA 210 (extra sheet) (January 1985)

International Application No. PCT/US 90/05525

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

Y	The Journal of Cell Biology, vol. 103, no. 6, pt 2, December 1986, M.J. Humphries et al.: "Identification of an alternatively spliced site in human plasma fibronectin that mediates cell-type-specific adhesion", pages 2637-2647 see the whole article WO, A, 88/01279 (COMMONWEALTH SCIENTIFIC & INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION) 25 February 1988 see claims --	1-5, 11, 12, 26, 42
---	--	------------------------

VI. OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSearchABLE

This International search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reason:

Claim numbers because they relate to parts of the International application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International search can be carried out, specifically:

Claim numbers because they relate to parts of the International application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International search can be carried out, specifically:

Claim numbers because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentence of PCT Rule 6.4(a).

VI. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application as follows:

1. claims 1-49, 60-65; 2. claims 50-59; 3. claims 66-95
for further information see form PCT/ISA/206 dd 21.01.91

As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers all searchable claims of the International application.

As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers only those claims of the International application for which fees were paid, specifically claims:

No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International search report is restricted to 1-49, 60-65

As all searchable claims could be searched without effort (without any additional fee), the International Searching Authority did not make payment of any additional fee.

Remark on Patent:

The additional search fees were accompanied by applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA 210 (supplemental sheet 12) (January 1985)

国際調査報告

US 9005525

SA 40663

This annex lists the patent family members relating to the parent documents cited in the above-mentioned International search report.
The members are as contained in the European Patent Office EPO file as 05/04/91.
The European Patent Office is in no way liable for those patentees which are merely given for the purpose of information.

Father document cited in search report	Publication date	Pater family member(s)	Publication date
EP-A- 0278781	17-08-88	AU-B- 600112	02-08-90
		AU-A- 1394588	14-09-88
		WO-A- 8806039	25-08-88
US-A- 4614517	30-09-86	US-A- 4517686	21-05-85
		EP-A, B 0144867	08-08-84
		JP-T 500518	30-08-84
		WO-A- 8400540	16-02-84
		US-A- 4589881	20-05-86
		US-A- 4578079	25-03-86
		AU-A- 4661111	28-04-87
		4792525	20-12-88
WO-A- 8801279	25-02-88	AU-B- 592670	18-01-90
		AU-A- 7871187	08-03-88
		EP-A- 0277993	17-08-88
		JP-T- 1500641	09-03-89

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/83

第1頁の続き

⑤Int.Cl.⁵ 識別記号 庁内整理番号
C 07 K 17/08 7731-4H
17/14 7731-4H
C 12 M 3/00 A 2104-4B
C 12 N 5/08 11/08 Z 2121-4B

優先権主張 ⑥1990年5月21日⑦米国(U S)⑧527,198

⑨発明者 マシア, スチーブン, ピー. アメリカ合衆国78704 テキサス州オースチン, ロツク テラス
ドライブ 2503
⑩発明者 デサイ, ネイル, ピー. アメリカ合衆国78731 テキサス州オースチン, アパートメント 2
43, ウッドホロウ ドライブ 7201